



mgr inż. Maja Sołtyka

**ANALIZA PORÓWNAWCZA CYTOTOKSYCZNEGO
ODDZIAŁYWANIA POCHODNYCH 2-DEOKSY-D-GLUKOZY
(2-DG) W MODELU IN VITRO GLEJAKA
WIELOPOSTACIOWEGO**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: dr hab. n. med. inż. Beata Pająk, prof. WIHE
*(Samodzielna Pracownia Genetyki i Biologii
Molekularnej, Wojskowy Instytut Higieny i
Epidemiologii w Warszawie)*

Promotor pomocniczy: dr n. fiz. Marcin Ziemiak
*(Laboratorium Badań Strukturalnych i
Biochemicznych, Centrum Nauk Biologiczno-
Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego)*

Badania wykonano w: *Samodzielna Pracownia Genetyki i Biologii
Molekularnej, Wojskowy Instytut Higieny i
Epidemiologii w Warszawie*

Warszawa, 2022

Podziękowania

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania mojej Pani Promotor, prof.dr hab. Beacie Pająk Za nieocenioną pomoc i wsparcie udzielone w trakcie przygotowywania pracy doktorskiej. Dziękuję za ogrom przekazanej wiedzy, cenne wskazówki, wyrozumiałość i poświęcony czas. W sposób szczególny pragnę podziękować Pani Profesor za stałe motywowanie do pracy, optymizm i pozytywną energię inspirującą do działania.

Serdecznie dziękuję Panu dr Marcinowi Ziemiakowi, za pomoc i wsparcie w prowadzeniu doświadczeń, udzielanie wskazówek oraz za przekazaną wiedzę.

Wyrazy wdzięczności składam również Pani dr Ani Jaśkiewicz i Panu dr Tomaszowi Domoradzkiemu za pomoc w realizacji doświadczeń biologicznych.

Dziękuję Rodzicom i Dziadkom za ich wsparcie na całej mojej drodze edukacji. W szczególności dziękuję mojej Mamie za pomoc, motywację do działania i wiarę we mnie.

Finansowanie

Badania prowadzone były w ramach realizacji projektu OPUS „Molekularne i farmakologiczne podstawy działania inhibitorów glikolizy jako czynników przełamujących lekooporność glejaka” (UMO-2017/25/B/NZ3/00251), finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Oświadczenie promotora pracy

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data

Podpis promotora pracy.....

Oświadczenie autora pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza praca doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni/instytucie naukowo-badawczym.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data

Podpis autora pracy.....

Streszczenie

Analiza porównawcza cytotoksycznego oddziaływania pochodnych 2-deoksy-D-glukozy (2-DG) w modelu in vitro glejaka wielopostaciowego.

Komórki nowotworowe, szczególnie komórki GBM, preferencyjnie wykorzystują proces glikolizy jako źródło ATP nawet w warunkach dostępu do tlenu (efekt Warburga). Hamowanie glikolizy prowadzi do zahamowania wytwarzania energii i deficytu energetycznego prowadzącego do śmierci i selektywnej eliminacji komórek nowotworowych. Wykorzystanie inhibitorów glikolizy jest obiecującą strategią dla terapii przeciwnowotworowej.

2-deoksy-D-glukoza (2-DG) jest najlepiej poznanym inhibitorem glikolizy, który przekracza barierę krew-mózg i wnika do komórek za pomocą tych samych transporterów co glukoza. Ze względu na swoje niewystarczające właściwości farmakokinetyczne, 2-DG nie uzyskała rejestracji do stosowania w klinice. Zastosowanie nowych halogenopochodnych 2-DG (fluoro- jodo-, chloro-, bromo-) oraz acetylowanej pochodnej, WP1122, może poprawić wnikanie związków i ich wewnątrzkomórkową akumulację, a w konsekwencji pozwoli na uzyskanie niższych stężeń efektywnych.

Celem niniejszej pracy była analiza efektów biologicznych, molekularnego mechanizmu oddziaływania oraz znaczenia położenia podstawnika w nowych halogenopochodnych 2-DG (2-FG, 2-IG, 2-CG, 2-BG) oraz acetylowanej pochodnej 2-DG, WP1122, w modelu in vitro glejaka wielopostaciowego. Ponadto, celem przeprowadzonych badań była analiza wpływu pochodnych 2-DG na aktywność HK II, a także otrzymanie rekombinowanego białka ludzkiej HK II w systemie bakteryjnym i jego krystalizacja z oddziałującymi halogenopochodnymi.

Efekty cytotoksyczne wpływu 72 h inkubacji badanych związków z komórkami GBM linii U-251 i U-87 oceniono poprzez analizę przeżywalności (test MTS, wyznaczenie IC_{50}) w warunkach normoksji i symulowanej hipoksji, proliferacji (test BrdU) oraz natężenia biosyntezy białek w komórkach (test z SRB). Wykazano, że w zależności od dawki wszystkich badanych związków dochodzi do zahamowania żywotności i parametrów życiowych komórek obu linii. Molekularny mechanizm oddziaływania pochodnych 2-DG potwierdzono poprzez oznaczenie natężenia biosyntezy mleczanu oraz ocenę aktywności HK II. Dalsze analizy wykazały aktywację procesu autofagii, mającej protekcyjny wpływ na komórki, które w wyniku inkubacji z badanymi związkami ulegały apoptotycznej śmierci. Wykazano również, że pod wpływem analogów 2-DG aktywność HK II w układzie pozakomórkowym zostaje zahamowana, a najsilniejszymi inhibitorami są fluoropochodne. Wrażliwość komórek na

cytotoksyczne oddziaływanie badanych związków nie była istotnie różna w warunkach normoksji oraz w warunkach naśladujących hipoksję, co świadczy o silnie glikolitycznym metabolizmie komórek GBM. Przeprowadzono także krystalizację i analizę krystalograficzną pochodnych 2-DG oraz uzyskano rekombinowane białko ludzkiej HK II w systemie bakteryjnym *E. coli*, które zostało oczyszczone metodą IMAC i SEC. Trwają także próby krystalizacji uzyskanego białka.

Podsumowując uzyskane w ramach realizacji pracy doktorskiej wyniki, należy stwierdzić, iż mimo iż wszystkie wiązki wykazały aktywność cytotoksyczną wobec badanych komórek GBM to WP1122 oraz fluoropochodne okazały się najsilniejszymi inhibitorami glikolizy i istnieje uzasadniona potrzeba kontynuacji badań z ich udziałem. Najniższą aktywność wykazywały bromo- i chloro-pochodne 2-DG.

Biorąc pod uwagę zdolność przenikania bariery krew-mózg przez badane w niniejszej pracy związki, przy ograniczonej dostępności terapii GBM, badania analogów 2-DG powinny być kontynuowane w dalszych przedklinicznych i klinicznych etapach, zwłaszcza w kontekście terapii skojarzonej przeciwko glejakowi wielopostaciowemu.

Summary

Comparative analysis of cytotoxic activity of 2-deoxy-D-glucose (2-DG) analogs on the in vitro model of glioblastoma multiforme (GBM).

Cancer cells, especially GBM cells, preferentially use glycolysis process as a source of ATP, even under normoxic conditions (Warburg effect). Glycolysis inhibition leads to energy production inhibition, energy deficit and in consequence to death and selective elimination of cancer cells and thus it is a promising target in cancer therapy.

2-DG is the best known glycolysis inhibitor which crosses the blood-brain barrier and enters cells using the same transporters as glucose. However, due to its insufficient pharmacokinetic properties, this compound was not registered in clinic. New halogen 2-DG analogs (fluoro-, iodo-, chloro-, bromo-) and acetylated derivative, WP1122, are believed to have improved penetration and accumulation of compounds in cancer cells. In consequence lower treatment concentrations could become effective.

The aim of this study was to compare and determine molecular mechanism of the cytotoxic effect as well as to evaluate the influence of substituent of halogen 2-DG analogs (2-FG, 2-IG, 2-CG, 2-BG) and acetylated 2-DG analog, WP1122, on GBM U-251 and U-87 cell lines. Moreover, the aim of this research was to analyze the influence of 2-DG derivatives on HK II activity as well as to obtain recombinant human HK II protein in a bacterial system and to analyze its interaction with halogen derivatives by X-ray crystallography.

Within the project, cellular viability in normoxia and simulated hypoxia conditions (MTS test), proliferation (BrdU test) and protein synthesis (SRB test) upon 72 h of incubation with test compounds was analyzed in vitro on glioblastoma model. Obtained results showed that all compounds, depending on dose, statistically significantly reduced viability of both cell lines. Intensity of lactate production as well as hexokinase activity downregulation analyzes confirmed the mechanism of action by inhibiting glycolysis by all 2-DG analogs. Further analysis that cytotoxic action of analyzed compounds was mediated by apoptosis but not autophagy process activation, which had protective role for treated cells. Sensitivity of cells to the cytotoxic effect of tested compounds was not significantly different under normoxia and hypoxia-like conditions what proves the strongly glycolytic metabolism of GBM cells. Additionally, activity assays of HK II upon extracellular interaction with tested compounds showed that fluorine analogs are the strongest HK II inhibitors. Crystallization and X-ray crystallographic analysis of 2-DG analogs were also performed. Furthermore, recombinant human HK II protein was obtained in *E. coli* bacterial system and then purified by IMAC and SEC. There were also attempts on crystallization of the obtained HK II.

Summarizing the results obtained as part of doctoral dissertation, it should be stated that although all tested compounds showed cytotoxic activity against GBM cells, WP1122 and fluorine derivatives turned out to be the strongest inhibitors of glycolysis and promising drug candidates for future therapy. Chloro- and bromo-analogs did not exert significant cytotoxic effect. Taking into account the ability to penetrate the blood-brain barrier by 2-DG analogs and limited available GBM therapy, the development on 2-DG analogs should be continued in further preclinical and clinical stages, especially in the context of combined glioblastoma therapy.

Spis treści

Wykaz skrótów.....	13
1. Wstęp.....	17
1.1. Charakterystyka komórek nowotworowych glejaka wielopostaciowego	17
1.2. Metabolizm komórek nowotworowych.....	20
1.2.1. Mechanizm glikolizy tlenowej	24
1.2.2. Znaczenie heksokinazy w metabolizmie glukozy	25
1.3. Inhibitory glikolizy w terapii przeciwnowotworowej.....	26
1.4. Aktywność biologiczna 2-DG	28
1.4.1. Wewnątrzkomórkowy metabolizm 2-DG - hamowanie glikolizy	29
1.4.2. Indukcja autofagii.....	30
1.4.3. Indukcja apoptozy	32
1.4.4. Udział 2-DG w N-glikozylacji białek	33
1.5. 2-DG uwrażliwia komórki na chemio i radioterapię.....	36
1.6. Charakterystyka halogenopochodnych 2-DG	39
1.6.1. Znaczenie 2-Fluoro-D-glukozy (2-FG) w diagnostyce nowotworów	39
1.6.2. Właściwości przeciwnowotworowe nowych halogenopochodnych 2-DG	40
1.6.3. Inne modyfikacje 2-DG jako strategia poprawy ich właściwości przeciwnowotworowych – acetylacja	41
2. Cel pracy.....	43
3. Materiały i metody	44
3.1. Badania na modelu in vitro – hodowla komórek eukariotycznych	44
3.1.1. Linie komórkowe	44
3.1.2. Pożywki i odczynniki wykorzystywane w hodowli komórkowej.....	44
3.1.3. Materiały i sprzęt do hodowli.....	44
3.1.4. Pasażowanie i zamrażanie komórek.....	45
3.2. Badane związki.....	46
3.3. Procedury doświadczalne	47
3.3.1. Ocena żywotności komórek z wykorzystaniem testu MTS	48
3.3.2. Analiza żywotności komórek w warunkach symulujących warunki hipoksji	48
3.3.3. Badanie proliferacji komórek z użyciem testu BrdU	49
3.3.4. Ocena natężenia syntezy białka w komórkach z wykorzystaniem sulforodaminy	50
3.3.5. Ocena natężenia glikolizy poprzez ocenę syntezy kwasu mlekowego	50
3.3.6. Ocena aktywności heksokinazy.....	51
3.3.7. Ocena indukcji apoptozy poprzez ocenę aktywacji kaspazy 3.....	51
3.3.8. Ocena zmian ekspresji białek metodą Western-blot	52

3.3.9. Ocena zmian ultrastruktury komórek z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej (TEM) ..	54
3.4. Produkcja rekombinowanego białka ludzkiej Heksokinazy II.....	55
3.4.1. Klonowanie molekularne	55
3.4.2. Reakcja PCR insertu i wektora.....	55
3.4.3. Klonowanie molekularne z użyciem techniki Gibson Assembly.....	56
3.4.4. Transformacja bakterii kompetentnych metodą szoku termicznego.....	56
3.4.5. Transformacja do szczepu ekspresyjnego metodą szoku termicznego	57
3.4.6. Testowanie warunków ekspresji białka.....	57
3.4.7. Mutageneza plazmidu.....	58
3.4.8. Produkcja białka HK II w systemie bakteryjnym <i>E. coli</i> BL21 w dużej skali.....	59
3.4.9. Oczyszczanie białka	59
3.5. Badania biochemiczne i fizykochemiczne	60
3.5.1. Analiza hamowania aktywności HK II przez halogenopochodne w układzie pozakomórkowym.....	60
3.5.2. Krystalizacja pochodnych glukozy	61
3.5.3. Krystalizacja HK II	61
3.6. Analiza statystyczna	62
4. Wyniki.....	64
4.1. Badania na modelu <i>in vitro</i>	64
4.1.1. Wpływ halo-pochodnych 2-DG na żywotność komórek GBM w warunkach normoksji i symulowanej hipoksji.....	64
4.1.2. Wpływ halogenopochodnych 2-DG na proliferację komórek GBM	72
4.1.3. Wpływ halogenopochodnych na syntezę białka w komórkach GBM	76
4.1.4. Wpływ halogenopochodnych 2-DG na indukcję apoptozy w komórkach GBM.....	79
4.1.5. Ocena natężenia procesu glikolizy pod wpływem pochodnych 2-DG w komórkach GBM83	
4.1.6. Wpływ pochodnych 2-DG na aktywność HK II w komórkach GBM linii U-87 i U-251 ..	86
4.1.7. Wpływ halogenopochodnych 2-DG na indukcję autofagii w komórkach GBM.....	90
4.1.8. Wpływ halogenopochodnych 2-DG na zmiany ultrastruktury badanych komórek	92
4.2. Badania biochemiczne i fizykochemiczne	95
4.2.1. Produkcja rekombinowanego białka heksokinazy II.....	95
4.2.2. Próby krystalizacji białka HK II.....	101
4.2.3. Analiza struktury krystalicznej pochodnych 2-DG	101
4.2.4. Hamowanie aktywności HK II przez halogenopochodne w układzie pozakomórkowym.	103
5. Dyskusja	108
5.1. Specyfika metabolizmu komórek nowotworowych jako cel terapeutyczny	108
5.2. Hamowanie procesu glikolizy w terapii nowotworów	109
5.3. Inhibitory heksokinazy jako kandydaci na leki w terapii przeciwnowotworowej	110

5.4. 2-DG w terapii przeciwnowotworowej	111
5.5. Nowe pochodne 2-DG jako inhibitory heksokinazy	113
5.6. Aktywność biologiczna nowych pochodnych 2-DG.....	115
5.7. Znaczenie heterogenności nowotworu dla odpowiedzi na terapię.....	118
5.8. Znaczenie autofagii w odpowiedzi komórek GBM na działanie inhibitorów glikolizy	119
5.9. Podsumowanie.....	121
6. Wnioski	123
7. Piśmiennictwo	124
Wykaz Rycin	149
Wykaz Tabel.....	151

Wykaz skrótów

2,2-diFG	difluoro-2-deoksy-D-glukoza
2-BG	2-bromo-2-deoksy-D-glukoza
2-BM	2-bromo-2-deoksy-D-mannoza
2-CG	2-chloro-2-deoksy-D-glukoza
2-CM	2-chloro-2-deoksy-D-mannoza
2-DG	2-deoksy-D-glukoza
2-DG-6-P	2-deoksy-D-glukoza-6-fosforan
2-FG	2-fluoro-2-deoksy-D-glukoza
2-FM	2-fluoro-2-deoksy-D-mannoza
2-IG	2-jodo-2-deoksy-D-glukoza
2-IM	2-jodo-2-deoksy-D-mannoza
3-BrPA	ang. <i>3-bromopyruvate</i> , 3-bromopirogronian
5-FU	ang. <i>5-fluorouracil</i> , 5-fluorouracyl
ADP	ang. adenosine diphosphate, adenzyno-5'-difosforan
AML	ang. <i>acute myeloid leukemia</i>
AMPK	ang. <i>AMP-activated protein kinase</i> , kinaza aktywowana przez AMP
APS	ang. <i>ammonium persulfate</i> , nadsiarczan amonu
ATP	ang. adenosine triphosphate, adenzyno trifosforan
ATRX	ang. <i>alpha-thalassemia/mental retardation X-linked</i> , zespół alfa talasemia-opóźnienie umysłowe o dziedziczeniu sprzężonym z chromosome X, zespół ATR-X
BAD	ang. <i>Bcl-2-antagonist of cell death</i>
BBB	ang. <i>brain blood barrier</i> , bariera krew-mózg
Bcl-2	ang. <i>B-cell CLL/ lymphoma 2</i>
BrdU	ang. <i>bromodeoxyuridine</i> , bromodeoksyurydyna
BTP	ang. <i>beta-trace protein</i> , białko śladowe beta
CHX	ang. <i>cycloheximide</i> , cykloheximid
CQ	ang. <i>chloroquine</i> , chlorochina
DCA	ang. <i>dichloroacetate</i> , dichlorooctan
DHEA	ang. <i>dehydroepiandrosterone</i> , dehydroepiandrosteron
DMEM	ang. <i>Dulbecco's modified Eagle medium with phenol red and Glutamax</i> , modyfikowana pożywka Eagle'a Dulbecco z czerwieńią fenolową i Glutamax
DMOG	ang. <i>dimethylxalylglycine</i> , dimetyloksyglicyna

DMSO	ang. <i>dimethyl sulfoxide</i> , dimetylosulfotlenek
DTT	ang. <i>dithiothreitol</i> , ditiotreitol
EDTA	ang. <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> , kwas etylenodiaminotetraoctowy
EGFR	ang. <i>epidermal growth factor receptor</i> , receptor naskórkowego czynnika wzrostu
ER	ang. <i>endoplasmic reticulum</i> , retikulum endoplazmatyczne
FADH ₂	ang. <i>dihydroflavine-adenine dinucleotide</i> , dinukleotyd flawinoadeninowy
FBS	ang. <i>fetal bovine serum</i> , bydlęca surowica płodowa
FDA	ang. <i>Food and Drug Administration</i> , Agencja Żywności i Leków
FLIP	<i>FLICE-like inhibitory protein</i> , FLICE-podobne białko hamujące
FPLC	ang. <i>fast performance liquid chromatography</i> , szybkosprawna chromatografia cieczowa
G-6-P	ang. <i>glucose-6-phosphate</i> , glukoza-6-fosforan
GBM	ang. <i>glioblastoma multiforme</i> , glejak wielopostaciowy
GDP	ang. <i>guanosine diphosphate</i> , ganozyna-5'-difosforan
GLS1	ang. <i>glutaminase 1</i> , glutaminaza 1
GLUT	ang. <i>glucose transporters</i> , transporter glukozy
HEPES	ang. <i>(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HIF-1	ang. <i>hypoxia-inducible factor</i> , czynnik aktywowany hipoksją
HK	ang. <i>hexokinase</i> , heksokinaza
HRE	ang. <i>hypoxia response element</i> , element odpowiedzi na hipoksję
IDH1/2	ang. <i>isocitrate dehydrogenase</i> , dehydrogenaza izocytrynianowa
IGF2	ang. <i>insulin-like growth factor</i> , insulinopodobny czynnik wzrostu
IMAC	ang. <i>immobilized metal chelate affinity</i> , chromatografia powinowactwa do unieruchomionego jonu metalu
IPTG	ang. <i>isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside</i> , izopropyl-β-D-1-tiogalaktopiranozyd
IR	ang. <i>infrared</i> , promieniowanie podczerwone
KDN	ang. <i>deaminated neuraminic acid</i> , kwas 2-keto-3-deoksy-D-glicero-D-galaktonononowego
LB	ang. <i>lysogeny broth</i> , bulion lizogeny
LDHA	ang. <i>lactate dehydrogenase A</i> , dehydrogenaza mleczanowa
LLO	ang. <i>lipid-linked oligosaccharides</i> , oligosacharydy połączone z lipidami

MAP-LC3	ang. <i>microtubule-associated proteins light chain 3</i> , lekki łańcuch 3 białka związanego z mikrotubulami
Mcl-1	ang. <i>myeloid cell leukemia sequence 1</i> , sekwencja białka białaczki szpikowej 1
MDR	ang. <i>multidrug resistance</i> , odporność wielolekowa
MPI	ang. <i>mannose-6-phosphate isomerase</i> , izomeraza fosfomannozy
mTOR	ang. <i>mammalian target of rapamycin</i> , ssaczy cel rapamycyny
MTS	ang. <i>(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium</i>
NAC	ang. N-acetyl-L-cysteine, N-acetylo-L-cysteina
NAD	ang. <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i> , dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
NADH	ang. <i>nicotinamide adenine dinucleotide hydride</i> , dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PBS	ang. <i>phosphate-buffered saline</i> , roztwór fizjologiczny buforowany fosforanami
PDH	ang. pyruvate dehydrogenase
PKD1	ang. <i>pyruvate dehydrogenase kinase 1</i> , dehydrogenaza pirogronianowa
PEP	ang. <i>phosphoenolpyruvate</i> , pirogronian fosfenolu
PET	ang. <i>positron emission tomography</i> , pozytonowa tomografia emisyjna
PGI	ang. <i>phosphoglucose isomerase</i> , izomeraza glukozo-6-fosforanowa
PI-3K	ang. <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i> , 3-kinaza fosfatydyloinozytolu
PK	ang. <i>pyruvate kinase</i> , kinaza pirogronianowa
PKM2	ang. <i>pyruvate kinase M2</i> , kinaza pirogronianowa M2
PMM2	ang. <i>phosphomannomutase 2</i> , fosfomannomutaza 2
PMSF	ang. <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> , fluorek fenylometylosulfonylu
PTEN	ang. <i>phosphatase and tensin homolog</i> , ludzkie białko kodowane przez gen supresorowy <i>PTEN</i>
PUMA	ang. <i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i> , regulowany przez p53 modulator apoptozy
PVDF	ang. <i>poly(vinylfluoride)</i> , polifluorek winylidenu
RB	ang. <i>retinoblastoma</i> , siatkówczak
RCC	ang. <i>renal cell carcinoma</i> , rak nerkowokomórkowy
Rho123	ang. <i>rhodamine 123</i> , rodamina 123
RIP	ang. <i>receptor interacting protein</i> , białko oddziałujące z receptorem
ROS	ang. <i>reactive oxygen species</i> , reaktywne formy tlenu

RT	ang. <i>room temperature</i> , temperatura pokojowa
SDS	ang. <i>sodium dodecyl sulfate</i> , siarczan dodecyłu
SEC	ang. <i>size exclusion chromatography</i> , chromatografia wykluczania
SGLT	ang. <i>sodium-glucose co-transporter</i> , kotransporter glukozy-sodowy
SOC	ang. <i>super optimal catabolite repression</i> , kompletna bogata pożywka
SRB	ang. <i>sulphorodamine</i> , sulforodamina
TCEP	ang. <i>tris(2-carboxyethyl)phospine</i> , tris(2-karboksyetylo)fosfina
TEM	ang. <i>transmission electron microscopy</i> , transmisyjna mikroskopia elektronowa
TEMED	ang. <i>N,N,N',N'- tetramethylethylenediamine</i> N,N,N',N'- tetrametyloetylenodiamina
TERT	ang. <i>telomerase reverse transcriptase</i> , telomeraza o aktywności odwrotnej transkryptazy
TMZ	ang. temozolomide, temozolomid
TNF	ang. <i>tumor necrosis factor</i> , czynnik martwicy nowotworowej
TORC1/2	ang. <i>target of rapamycin complex 1/2</i> , cel rapamycyny kompleks 1/2
TP53	ang. <i>tumor protein 53</i>
TRAIL	ang. <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i> , ligand czynnika martwicy nowotworu indukujący apoptozę
UPR	ang. <i>unfolded protein response</i> , odpowiedź niepofałdowanych białek
VDAC	ang. <i>voltage-dependent anion channel</i> , kanał jonowy zależny od napięcia
VEGF	ang. <i>vascular endothelial growth factor</i> , czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego
WHO	ang. <i>World Health Organization</i> , Światowa Organizacja Zdrowia
WP1122	3,6-di-O-acetylo-2-deoxy-D-glukoza

1. Wstęp

Rak jest drugą najczęstszą przyczyną zgonów na świecie. Według Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organisation*, WHO) w 2020 roku nowotwory odpowiadały za 10 mln zgonów na świecie. Według szacunków Siegel'a i wsp. [1] jedna na trzy osoby zachoruje na nowotwór w trakcie swojego życia. Obciążenie nowotworami stale globalnie rośnie powodując nie tylko dyskomfort fizyczny i psychiczny dla dotkniętych nimi pacjentów i ich rodzin, ale także finansowy dla ogółu społeczeństwa i systemów opieki zdrowotnej. Konieczne jest zatem dogłębne poznanie i zrozumienie procesu kancerogenezy, zasad kierujących tą chorobą i leżących u jej podstaw szlaków molekularnych i biochemicznych. Potrzebna jest także ciągła praca nad doskonaleniem diagnostyki, obrazowania oraz poszukiwanie nowych, mniej toksycznych i bardziej selektywnych związków o właściwościach przeciwnowotworowych.

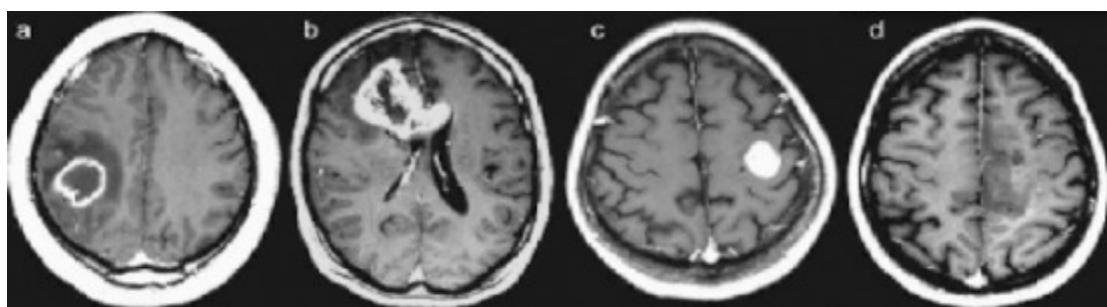
1.1. Charakterystyka komórek nowotworowych glejaka wielopostaciowego

Nowotworem nazywamy grupę chorób obejmującą zmiany w genomie, których konsekwencjami są niekontrolowany wzrost komórek oraz ich rozprzestrzenianie się i inwazja do innych części ciała. Obecnie sklasyfikowano ponad 200 typów nowotworów [2]. U podstaw rozwoju choroby nowotworowej leży akumulacja mutacji komórkowych w protoonkogenach lub/i genach supresorowych. Mutacje w protoonkogenach prowadzą do konstytutywnej aktywacji onkogenów, ich nadmiernej funkcji i niekontrolowanej proliferacji komórek. Z kolei mutacje w genach supresorowych prowadzą do utraty ich funkcji i odhamowania procesów komórkowych [3]. Wszystkie komórki tworzące guz pierwotny pochodzą z jednej komórki zawierającej zakumulowane mutacje. Proces inicjacji rozwoju nowotworu jest zatem klonalny [4]. W obrębie nowotworów wyróżnia się guzy łagodne i złośliwe. Te pierwsze nie mają zdolności do rozprzestrzeniania się po organizmie i w większości przypadków nie zagrażają życiu pacjenta. Guzy złośliwe wykazują cechy inwazji i tworzenia przerzutów.

Jednym z najbardziej agresywnych nowotworów jest glejak wielopostaciowy (ang. *glioblastoma multiforme*, GBM). GBM to nowotwór pierwotny ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Spośród wszystkich nowotworów komórek glejowych, glejak wielopostaciowy charakteryzuje się największym stopniem złośliwości (stopień IV) w klasyfikacji WHO. Mimo, że zapadalność na tą chorobę jest stosunkowo niska, wynosi ok. 5-10 przypadków/100 tys. osób rocznie [5], to wyjątkowo niepomyślne rokowania pacjentów sprawiają, że GBM jest jednym z głównych problemów zdrowia publicznego [6,7]. Mediana przeżycia chorych z GBM od diagnozy choroby wynosi 12 miesięcy, a tylko 3-8% osób żyje

dłużej niż 3 lata [5,8]. Zachorowalność na GBM jest proporcjonalna do wieku, a najwięcej zachorowań odnotowuje się w grupie wiekowej 50-60 lat [9]. Nie są znane dokładne przyczyny powstawania GBM. Jak dotąd, jedynym potwierdzonym czynnikiem ryzyka jest narażenie na wysokie dawki promieniowania jonizującego [10]. Predyspozycje genetyczne GBM zaobserwowano jedynie w 5-10% przypadków [11]. Glejaki dzieli się na pierwotne, powstające „de novo”, bez znanego klinicznego prekursora oraz wtórne, które są konsekwencją wzrostu złośliwości glejaka o niższym stopniu klasyfikacji WHO. Liczne analizy wykazały, że zmiany genetyczne towarzyszące pierwotnym GBM dotyczą głównie trzech genów: *TERT* (ang. *telomerase reverse transcriptase*), *PTEN* (ang. *phosphatase and tensin homolog*) oraz *EGFR* (ang. *epidermal growth factor receptor*). Podczas gdy mutacje w genach *IDH1/2* (ang. *isocitrate dehydrogenase*), *TP53* (ang. *tumor protein 53*), *ATRX* (ang. *alpha-thalassemia/mental retardation, X-linked*) i *RB* (ang. *retinoblastoma*) charakteryzują wtórne GBM [12]. Szlak p53 jest zmutowany aż u 87% pacjentów a szlak sygnałowy RB u ok 78% przypadków [12]. Glejak wielopostaciowy najczęściej zlokalizowany jest w półkulach mózgowych - 95% przypadków znajduje się w okolicy nadnamiotowej a jedynie kilka procent guzów występuje w mózdzku, pniu mózgu i rdzeniu kręgowym [13].

Obraz histologiczny glejaka wielopostaciowego, jak nazwa wskazuje, jest bardzo zróżnicowany - guz jest niejednorodny i może objawiać się w postaci wieloogniskowych krwotoków, martwicy, a także obszarów torbielowatych [14]. Jak przedstawiono na Rycinie nr 1, u różnych pacjentów może wykazywać znaczne różnice w swojej strukturze. Jego charakterystyczną cechą jest również pleomorfizm komórek.



Rycina 1. Niejednorodność zmian anatomicznych glejaka wielopostaciowego. A) Wyodrębniona przez obwódkę centralna martwica z otaczającym obrzękiem w prawym płacie czołowym, B) Nieregularnie zwiększająca się masa przecinająca ciało modzelowate, C) wyraźnie odgraniczona masa w lewym płacie czołowym bez towarzyszącego obrzęku, D) słabo zdefiniowana masa naciekająca w lewym przyśrodkowym płacie czołowym bez towarzyszącego obrzęku [15].

Głównymi wyzwaniem terapii GBM są lokalizacja guza, konieczność przekraczania przez lek bariery krew-mózg (BBB), a także jego niejednorodność tkankowa [16]. Standardowe

postępowanie terapeutyczne GBM obejmuje chirurgiczną resekcję guza wraz z radioterapią a następnie uzupełniającą chemioterapię Temozolomidem (TMZ) podawanym doustnie [17]. Mechanizm działania TMZ opiera się na metylacji DNA, która prowadzi do uszkodzeń struktury DNA i zaburzeń proliferacji komórek.

Mimo, że postęp w terapii nowotworów następuje szybko, leczenie GBM nie zmieniło się znacząco od 1999 roku, kiedy to TMZ został zaakceptowany jako lek [18]. Efektywność terapeutyczna TMZ jest jednak niezadowolająca, ze względu na obecność u prawie połowy pacjentów, nadaktywację mechanizmów naprawy DNA, ograniczającą lub znoszącą działanie TMZ [19,20]. Ponadto, jego wpływ na całkowity okres przeżycia pacjentów jest także nieznaczny (kilka miesięcy). TMZ generuje również szereg skutków ubocznych jak nudności, wymioty, biegunki, działania niepożądane ze strony układu nerwowego - drgawki, zaburzenia świadomości, pamięci, oraz zaburzenia wzroku i słuchu [21]. W przypadku stosowania dużych dawek TMZ istnieje wysokie prawdopodobieństwo utraty zdolności krwiotwórczej przez komórki szpiku. Ponadto, TMZ może powodować zaburzenia płodności lub nawet bezpłodność. W konsekwencji możliwości stosowania TMZ są ograniczone ze względu na tzw. ogólny stan zdrowia pacjenta i jego znaczne obciążenie przez TMZ. Nowoczesne chemioterapeutyki stosowane w terapiach przeciwnowotworowych oddziałują na wybrane cele molekularne (jak kinazy), przez co wykazują wyższą skuteczność, specyficzność oraz ograniczają efekty niepożądane. Kanonem terapii jest obecnie stosowanie terapii skojarzonych, które mogą synergistycznie eliminować komórki nowotworowe.

Komórki nowotworowe, mimo że wywodzą się z komórek prawidłowych i są do nich zbliżone, posiadają także cechy unikalne. Cechy fenotypowe komórek nowotworowych zostały zdefiniowane przez dwóch amerykańskich badaczy – Hannahan'a i Weinberga [22] jako: unikanie apoptozy, brak wrażliwości na inhibitory wzrostu, niezależność od sygnałów wzrostu, nieograniczony potencjał replikacyjny, zdolność angiogenezy i inwazji do sąsiednich tkanek. Dziesięć lat później do cech komórek nowotworowych dodano cztery kolejne: unikanie odpowiedzi immunologicznej, niestabilność genetyczną, indukcję stanu zapalnego w organizmie i zmiany w metabolizmie komórki [23]. W zależności od rodzaju nowotworu, wszystkie lub tylko wybrane cechy mogą pojawić się w różnej kolejności na kolejnych etapach rozwoju nowotworu. Zaprojektowanie terapii ukierunkowanej na specyficzne dla nowotworu cechy może prowadzić do selektywnego niszczenia komórek rakowych. Jedną z rozwijanych strategii terapeutycznych jest ukierunkowane oddziaływanie na odmienny metabolizm komórkowy.

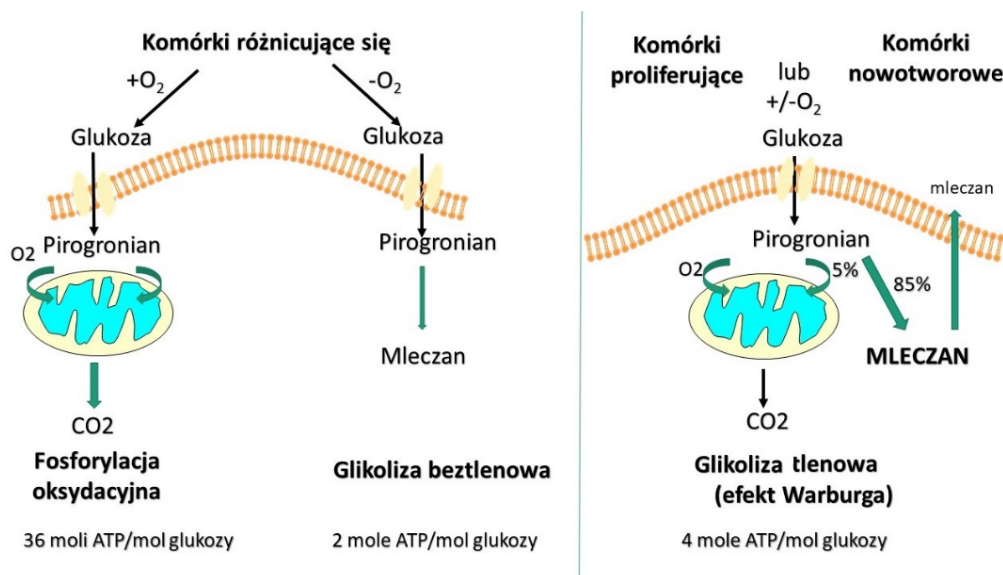
1.2. Metabolizm komórek nowotworowych

Obiecującym celem terapii przeciwnowotworowej jest szlak metabolizmu glukozy, ponieważ w komórkach nowotworowych różni się on znacznie od metabolizmu komórek prawidłowych [24]. Zwiększone tempo proliferacji, dojrzewania i różnicowania komórek nowotworowych oraz szybki wzrost guza, prowadzi do zwiększonego zapotrzebowania na składniki odżywcze, w tym glukozę [24]. Pierwszą odpowiedzią komórek nowotworowych na niekorzystne warunki jest zmiana metabolizmu z tlenowego na beztlenowy. Głównym procesem utylizacji glukozy staje się proces glikolizy. Zjawisko to po raz pierwszy opisał laureat Nagrody Nobla, Otto Warburg, w latach dwudziestych XX wieku [25]. Wysoka zależność komórek nowotworowych od procesu glikolizy stwarza możliwość selektywnego ich eliminowania poprzez hamowanie tego procesu.

Większość komórek nowotworowych różnego pochodzenia preferencyjnie wykorzystuje proces glikolizy do utylizacji glukozy i wytwarzania energii w postaci ATP, niezależnie od dostępności tlenu w otoczeniu [26]. Zjawisko to jest określane mianem glikolizy tlenowej lub efektem Warburga. Istnieje wiele doniesień wskazujących na korelację pomiędzy udziałem wytwarzanej energii pochodzącej z procesu glikolizy tlenowej, a złośliwością nowotworu [27]. Należy zauważyć, że metabolizm komórkowy jest również zależny od innych szlaków sygnałowych, regulujących aktywność onkogenów i genów supresorowych. Na przykład, inaktywacja białka p53 stymuluje efekt Warburga poprzez regulację transkrypcji genów zaangażowanych w metabolizm energetyczny, w tym genów *SCO2*, *TIGAR*, *GLS2* [28]. Ważnym skutkiem przeprogramowania metabolizmu nowotworów na metabolizm glikolizy tlenowej jest także immunosupresja nowotworowa. Wysokie tempo pobierania glukozy koniecznej do podtrzymania procesu glikolizy i zmniejszenie puli glukozy zewnątrzkomórkowej powoduje hamowanie procesu glikolizy i funkcji efektorowej limfocytów T atakujących guz [29,30]. W efekcie komórki nowotworowe mogą modyfikować cechy mikrośrodowiska i wpływać na skierowaną przeciwko nim odpowiedź immunologiczną [31].

Glukoza jest najpowszechniejszym źródłem energii komórkowej i substratem dla wielu procesów biochemicznych. Glukoza jest wytwarzana głównie z węglowodanów spożytych w diecie ale może również być syntetyzowana w organizmie dzięki mechanizmowi glukoneogenezy [32]. Błona lipidowa otaczająca komórkę stanowi nieprzepuszczalną barierę dla hydrofilowych cząsteczek glukozy. Jej wychwyt z otoczenia i transport przez błonę komórkową wymaga specyficznych białek - transporterów glukozy (ang. *glucose transporters*, GLUT). Białka z rodziny GLUT transportują heksozy zgodnie z gradientem stężeń i z różnym

powinowactwem względem substratu [33]. W badaniach swoistości substratowej heksoz wykazano bardzo znaczącą wydajność transportu zarówno glukozy (K_m ok. 3 mM) [34] jak i jej pochodnej 2-deoksyglukozy (2-DG) (K_m ok. 5 mM) [35]. Komórki nowotworowe charakteryzuje przyspieszony metabolizm, czego konsekwencją jest wzrost zapotrzebowania na glukozę. Szacuje się, iż komórki nowotworowe charakteryzuje ponad 20–30-krotnie większy wychwyty glukozy w porównaniu z prawidłowymi komórkami, dzięki nadekspresji transporterów GLUT w błonie komórkowej [36,37]. Wewnątrz komórki glukoza włączana jest w cykl przemian, aby ostatecznie wytworzyć energię w postaci cząsteczek ATP. W komórkach prawidłowych, w warunkach dostępności tlenu, glukoza metabolizowana jest w procesie glikolizy do pirogronianu, który jest następnie utleniany w mitochondriach poprzez kompleks dehydrogenazy pirogronianowej do acetylo-koenzymu A (acetylo-CoA). Acetylo-CoA jest włączany w cykl Krebsa i utleniany do dwóch cząsteczek CO_2 . Dzięki elektronom pochodzącym z tego procesu powstają trzy cząsteczki NADH i jedna cząsteczka $FADH_2$. Cząsteczki $FADH_2$ są ponownie utleniane poprzez układy oksydoredukcyjne łańcucha oddechowego, który umożliwia tworzenie ATP z ADP i fosforanu [38]. W wyniku fosforylacji oksydacyjnej z przemian jednej cząsteczki powstaje ostatecznie 36 cząsteczek ATP. Proces glikolizy tlenowej jest dużo mniej wydajny, a z jednej cząsteczki glukozy są generowane tylko 4 cząsteczki ATP [39]. Tlen jest ważny dla procesu utleniania glukozy, gdyż służy jako końcowy akceptor elektronów, umożliwiający całkowite utlenienie glukozy. Także w przypadku niewystarczającego stężenia tlenu, następuje przekierowanie metabolizmu na szlak glikolizy. W jej końcowym etapie pirogronian jest redukowany do mleczanu, redukując NADH do $NAD +$ [40]. Schematyczne porównanie procesu glikolizy tlenowej, glikolizy beztlenowej i fosforylacji oksydacyjnej przedstawiono na Rycinie nr 2.

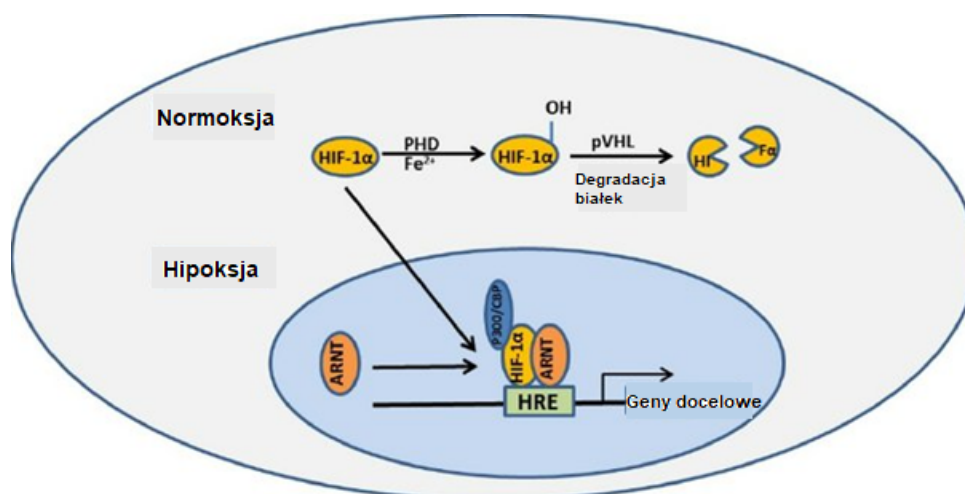


Rycina 2. Porównanie metabolizmu glukozy w komórkach zróżnicowanych oraz komórkach nowotworowych. Większość zróżnicowanych komórek, w warunkach dostępu do tlenu wykorzystuje do metabolizmu glukozy szlak fosforylacji oksydacyjnej. Mechanizm ten pozwala na uzyskanie 36 moli ATP z 1 mola glukozy. W przypadku niewystarczającej ilości tlenu komórki te z jednego mola glukozy uzyskują tylko 2 mole ATP przy jednoczesnym uwalnianiu kwasu mlekowego. Komórki nowotworowe, niezależnie od dostępności tlenu produkują znaczne ilości kwasu mlekowego wytwarzając przy tym 4 mole ATP z jednego mola glukozy [41].

Częstym zjawiskiem towarzyszącym rozwojowi guza jest ograniczenie dostępności tlenu i rozwój hipoksji. Aby zaadaptować się do środowiska hipoksji, komórki nowotworowe przeprogramowują protoonkogeny (np. *c-Myc*), wprowadzają zmiany w szlakach sygnałowych (np. PI-3K/Akt) oraz aktywują specyficzne czynniki transkrypcyjne (np. HIF-1 α) [39]. Następstwa te są bezpośrednim skutkiem generowania przez komórki nowotworowe wolnych rodników, które prowadzą do stresu oksydacyjnego skutkującego aktywacją HIF-1 α [42].

Czynnik transkrypcyjny HIF-1 α (ang. *hypoxia-inducible factor 1*, czynnik aktywowany hipoksją) odgrywa kluczową rolę w przeprogramowywaniu metabolizmu komórek nowotworowych [43]. HIF-1 ma budowę heterodimeryczną, a w jego skład wchodzi podjednostka HIF-1 α oraz podjednostka HIF-1 β [44]. Poziom HIF-1 α koreluje z ilością dostępnego tlenu i gwałtownie wzrasta na skutek hipoksji [45]. Z kolei podjednostka HIF-1 β podlega stabilnej ekspresji niezwiązanej z dostępnością tlenu [45]. W warunkach dostępu do tlenu HIF-1 jest nieaktywny ponieważ podjednostka HIF-1 α ulega degradacji [46]. W warunkach hipoksji ulegają inaktywacji enzymy degradujące HIF-1 α , dzięki czemu podjednostka ta uzyskuje stabilność i zostaje przekierowana do jądra komórkowego, gdzie łącząc się z podjednostką HIF-1 β tworzy heterodimer. Heterodimer HIF-1 α wiąże się z

regionem DNA, elementem odpowiedzi na hipoksję HRE, (ang. *hypoxia response element*, HRE), co aktywuje transkrypcję genów docelowych [47] (Rycina 3).



Rycina 3. Regulacja genów przez kompleks ARNT/HIF-1β/HIF-1α w komórkach ssaków w warunkach normoksji i hipoksji [48].

Zależne od aktywności HIF-1 białka komórkowe regulują szereg procesów komórkowych promujących złośliwy charakter nowotworu. HIF-1α reguluje równowagę między zużyciem tlenu, a produkcją ATP oraz uszkadzających reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS) [49]. Ponadto, HIF-1 stymuluje ekspresję insulinopodobnego czynnika wzrostu 2 (ang. *insulin-like growth factor*, IGF2), który poprzez aktywację kolejnych szlaków sygnałowych wpływa na progresję guza [50]. Badania przeprowadzone na tkankach potwierdzają silną zależność poziomu ekspresji białek transportujących glukozę GLUT od aktywacji HIF-1 [51]. Czynnikiem ten aktywuje również transkrypcję genów kodujących enzymy glikolityczne, takie jak heksokinaza (ang. *hexokinase*, HK), kinaza pirogronianowa M2 (ang. *pyruvate kinase M2*, PKM2) oraz dehydrogenaza mleczanowa (ang. *lactate dehydrogenase A*, LDHA). Skutkuje to nie tylko samym przesunięciem metabolizmu glukozy w kierunku glikolizy, ale też wyhamowaniem procesu oddychania mitochondrialnego, co jest spowodowane wzrostem ekspresji kinazy dehydrogenazy pirogronianowej (ang. *pyruvate dehydrogenase kinase 1*, PDK1) [52]. Ważnym dla rozwoju nowotworu efektem wzmożonej aktywności czynnika HIF-1 jest aktywacja transkrypcji genu czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) [53-55]. Aktywny VEGF indukuje proces angiogenezy, w którym proliferacja komórek śródbłonna umożliwia tworzenie nowych naczyń krwionośnych zaopatrujących guz w krew [56].

Wysoki poziom HIF-1 α jest cechą charakterystyczną komórek nowotworowych i wzrasta proporcjonalnie do stopnia zaawansowania guza [57]. Jego ekspresja jest jednak zróżnicowana w zależności od typu nowotworu. Nowotworami o najwyższej ekspresji HIF-1 α , a tym samym wysoce glikolitycznym metabolizmie są glejaki oraz rak trzustki [58].

GBM jest nowotworem o wysoce glikolitycznym fenotypie, co wspomaga m.in. obecność mutacji w genie *IDH1* [59]. Szacuje się, że u około 80% glejaków II i III stopnia, gen *IDH1* jest zmutowany [10]. IDH1 jest enzymem cyklu Krebsa odpowiedzialnym za utlenianie białek, kwasów tłuszczowych oraz węglowodanów [10,60]. Konsekwencją mutacji *IDH1* jest spadek aktywności enzymu, a w konsekwencji obniżenie stężenia α -ketoglutaranu, substratu dla hydroksylaz prolinowych [60,61]. W warunkach normoksji hydroksylazy prolinowe rozkładają podjednostkę HIF-1 α , a ich niewystarczająca aktywność prowadzi do podtrzymania aktywności HIF-1 α . W konsekwencji komórki wykazują fenotyp typowy dla warunków hipoksji nawet w warunkach dostępu tlenu [60,61].

1.2.1. Mechanizm glikolizy tlenowej

Cząsteczka glukozy, po wnikięciu do komórki ulega fosforylacji do glukozo-6-fosforanu (G-6-P) przez HK, a następnie jest przekształcana przez izomerazę fosfoglukozową (ang. *phosphoglucose isomerase*, PGI) do fruktozo-6-fosforanu (F-6-P), lub też metabolizowana przez dehydrogenazę glukozo-6-fosforanową (ang. *glucose-6-phosphate dehydrogenase*) w szlaku pentozofosforanowym [62]. W następnym etapie, fosfofruktokinaza katalizuje F-6-P do fruktozo-1,6-bifosforanu (F-1-6-BP). Ten etap jest nieodwracalny oraz zależny od ATP, ponieważ może być przez nie allosterycznie hamowany. F-1-6-BP jest przekształcany w gliceraldehyd-3-P, lub w fosforan dihydroksyacetonu, który wykorzystywany jest w biosyntezie fosfolipidów i triacylogliceroli [63]. W ostatnich etapach glikolizy, pirogronian fosfenolu (PEP) ulega przekształceniu do pirogronianu przy udziale kinazy pirogronianowej (ang. *pyruvate kinase*, PK) [63,64].

W organizmie człowieka występują cztery izoformy PK (PKM1, PKM2, PKR i PKL), które różnią się między sobą budową, właściwościami kinetycznymi i ekspresją tkankowo-specyficzną [65]. W komórkach prawidłowych, wszystkie izoformy PK występują w formie tetramerycznej, która w przypadku dwóch pierwszych izoform, dzięki swojemu wysokiemu powinowactwu do PEP, katalizuje reakcję syntezy pirogronianu i ATP (PKR oraz PKL, mimo formy tetramerycznej wykazują słabe powinowactwo do PEP) [66]. W komórkach dzielących się, zwłaszcza nowotworowych, dominującą izoformą jest PKM2 [67], który może występować zarówno w formie tetramerycznej, o wysokiej aktywności jak i dimerycznej, o niskiej

aktywności. Forma PKM2 determinuje losy przekształceń glukozy do mleczanu i syntezy cząsteczek ATP (forma tetrameryczna, efekt Warburga), czy też akumulację intermediatów glikolizy, które mogą być wykorzystane do reakcji biosyntezy (forma dimeryczna) [66]. Luo i wsp. [68], wskazali rolę PKM2 jako transkrypcyjnego koaktywatora HIF-1. Bezpośrednie przyłączenie PKM2 do HIF-1 ułatwia jego przyłączenie do DNA, co skutkuje zwiększeniem transkrypcji genów indukowanych przez HIF-1. W konsekwencji dochodzi do zmiany metabolizmu glukozy na glikolityczny. Postuluje się, iż zmiana izoformy PK w komórkach nowotworowych z dimerycznej na tetrameryczną umożliwia proliferację i wzrost komórkom nowotworowym znajdującym się w środowisku o małej zawartości tlenu i składników odżywczych [69]. Ponadto warto zauważyć, że PKM2 jest regulatorem metabolizmu antyoksydacyjnego i kontroluje homeostazę reakcji redoks. Kontrola wewnątrzkomórkowego poziomu wolnych rodników jest niezbędna do przeżycia komórek nowotworowych [70].

W środowisku ubogim w tlen dochodzi również do nadekspresji dehydrogenazy mleczanowej. Enzym ten katalizuje przekształcanie pirogronianu i NADH w mleczan i NAD^+ . W komórkach nowotworowych, w wyniku zahamowania oddychania mitochondrialnego oraz nasilonej glikolizy, dochodzi do akumulacji cząsteczek pirogronianu [71,72]. Nagromadzenie pirogronianu prowadzi do zwiększonego uwalniania mleczanu, co z kolei prowadzi do obniżenia wewnątrzkomórkowego poziomu pH i kwasicy [47]. Mleczan jest wydalany poza komórkę za pomocą transportera MCT4 (ang. *monocarboxylate transporter 4*), którego ekspresja również regulowana jest przez aktywny HIF-1 [73]. Ogólny schemat metabolizmu glukozy został przedstawiony na Rycinie 2.

1.2.2. Znaczenie heksokinazy w metabolizmie glukozy

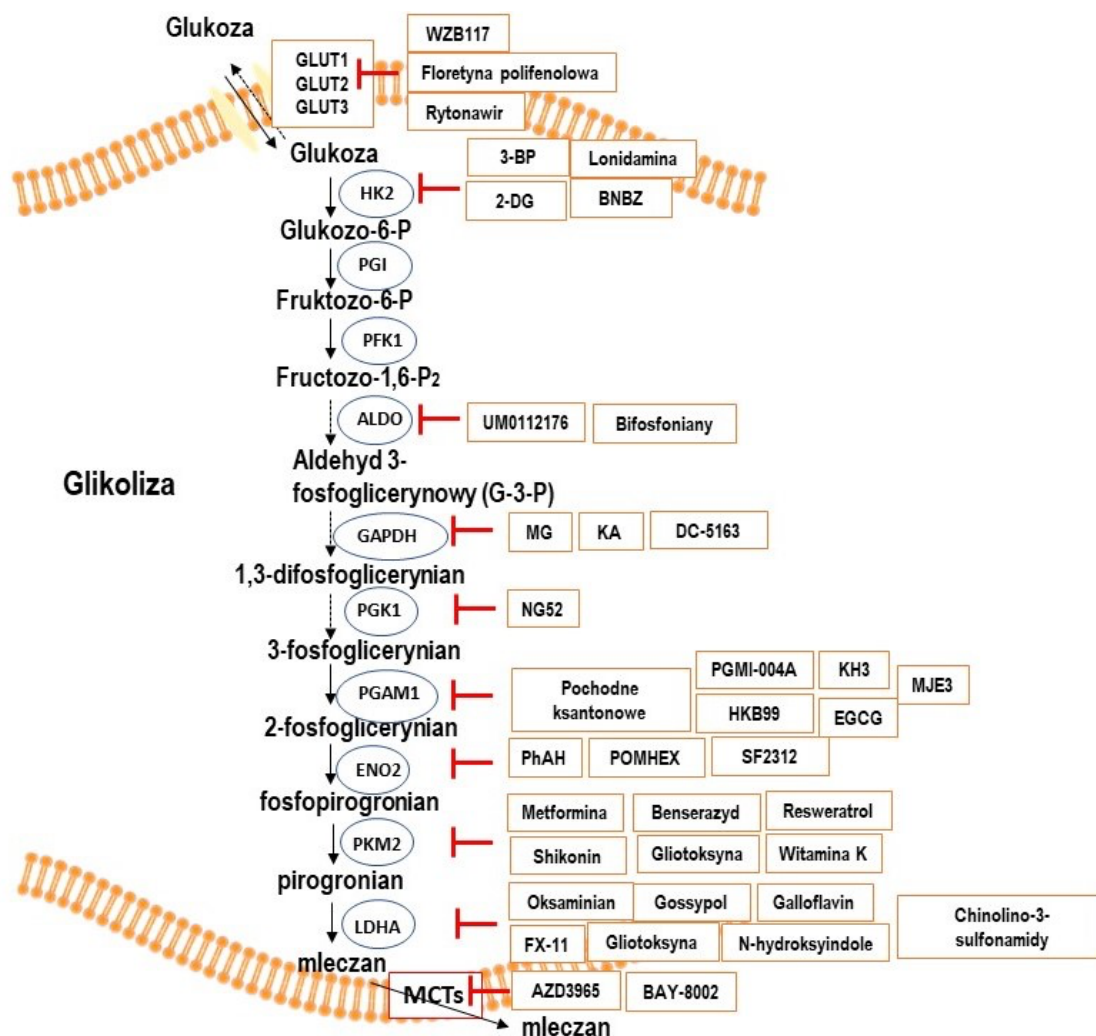
Pierwszym enzymem w procesie utylizacji glukozy w komórce jest heksokinaza. Heksokinazy to enzymy fosforylujące grupę hydroksylową w pozycji C6 w cukrach takich jak glukoza i inne blisko spokrewnione heksozy (mannoza, 2-deoksyglukoza, glukozamina i fruktoza). Reakcja zachodzi z udziałem ATP, który jest donorem grupy fosforanowej. U ssaków wyróżnia się cztery izoformy HK (I-IV), różniące się między sobą strukturą, miejscem występowania oraz funkcjami [74]. W komórkach nowotworowych kluczowe znaczenie odgrywa aktywność HK II, której ekspresja jest zwykle utrzymywana na niskim poziomie w tkankach prawidłowych [75]. Wysoki poziom HK II koreluje z przyspieszoną progresją, gorszym rokowaniem i wyższą opornością na leczenie w raku piersi (zarówno pierwotnym, jak i przerzutowym) [76,77], raku pęcherza [78], szyjki macicy [79], jelita grubego [80], guzie nabłonkowym jajnika [81], glejaku wielopostaciowym [82], raku wątroby [83], krtani [84], płuc

[85], trzustki [86], prostaty [87] i innych, co czyni go potencjalnym celem dla rozwoju terapii celowanej. Specyficzne ukierunkowanie na enzymy szlaku glikolizy stanowi jednak wyzwanie, gdyż znalezienie selektywnych inhibitorów dla określonych izoform enzymów glikolitycznych jest procesem niezwykle trudnym.

HK II wiąże się z mitochondriami poprzez hydrofobowy N-końcowy region, który oddziałuje z kanałem anionowym regulowanym przez zmianę potencjału zależnego od napięcia kanału jonowego VDAC (ang. *voltage-dependent anion channel*). Kanał VDAC zlokalizowany w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, bierze udział w transporcie substancji rozpuszczonych o niskiej masie cząsteczkowej, oraz białek, takich jak cytochrom c (współtworzy on kompleks aktywujący kaspazę 9), które zostają uwalniane z mitochondriów w przebiegu procesu apoptozy [88]. Obecność HK II w bezpośrednim sąsiedztwie VDAC zapobiega ich aktywacji i tworzeniu porów przejściowych przenikalności mitochondrialnej, co hamuje proces apoptozy, zwiększa żywotność komórek nowotworowych oraz ich odporność na chemioterapeutyki [89]. Ze względu na zdolność oddziaływania HK z kompleksem VDAC enzym ten jest atrakcyjnym celem molekularnym w projektowaniu terapii przeciwnowotworowych, gdyż zahamowanie aktywności HK może oddziaływać na procesy metaboliczne komórki oraz programowanej śmierci [90].

1.3. Inhibitory glikolizy w terapii przeciwnowotworowej

Zjawisko zmiany metabolizmu komórek nowotworowych i preferencyjne wykorzystanie procesu glikolizy jako głównego szlaku obróbki glukozy w komórce, którego wydajność jest znacząco niższa niż oksydacyjnej fosforylacji, wymusza intensyfikację przemian glukozy aby zapewnić wystarczającą pulę cząsteczek ATP koniecznych do podtrzymania funkcji komórki. Z tego względu komórki nowotworowe istotnie szybciej pobierają glukozę do swojego wnętrza, co umożliwia nasiloną ekspresję transporterów błonowych GLUT [91]. Zależność komórek nowotworowych od dostępności glukozy i przebiegu procesu glikolizy jest atrakcyjnym celem terapeutycznym. Zahamowanie przebiegu procesu glikolizy skutkowałoby bowiem zahamowaniem wytwarzania ATP i deficytem energetycznym w komórce, prowadząc w konsekwencji do jej eliminacji [90]. Rycina nr 4 przedstawia przykłady związków hamujących metabolizm glukozy na różnych etapach procesu, które zostały wykorzystane w terapii.



Rycina 4. Związki hamujące aktywność transporterów glukozy lub enzymów szlaku glikolizy [92].

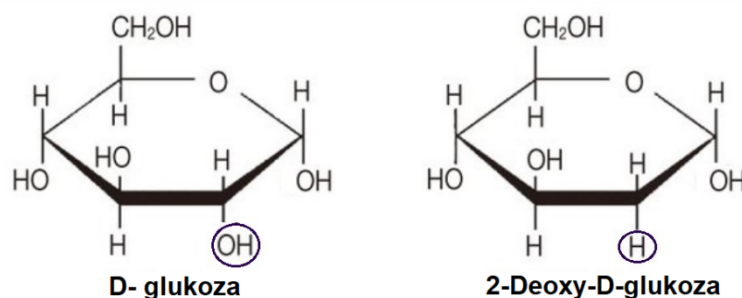
Wśród związków badanych dotychczas jako inhibitory HKII należy wymienić m.in. pochodne arsenianowe, lonidaminę, 3-bromopirogronian (3-BrPA) oraz 2-deoksy-D-glukozę (2-DG) [93-95]. 3-BrPA i lonidamina działają przez zablokowanie funkcji HK II, 2-DG hamuje aktywność HK II oraz pośrednio blokuje funkcję PGI. Z kolei pochodne arsenu na +V stopniu utlenienia nie hamują bezpośrednio procesu glikolizy, ale ze względu na podobieństwo do nieorganicznego fosforanu, zakłócają produkcję ATP, powodując arsenolizę w reakcji dehydrogenazy gliceraldehydo-3-fosforanu, hamując w konsekwencji wytwarzanie 1,3-bisfosfoglicerynianu [94].

Zahamowanie aktywności HK przez 3-BrPA powoduje zmniejszenie ilości ATP w komórkach nowotworowych i prowadzi do śmierci komórek [96,97]. Co ciekawe, hamowanie glikolizy przez 3-BrPA prowadzi również do defosforylacji białka proapoptotycznego związanego z Bcl-2 – BAD (ang. *Bcl-2 associated agonist of cell death*, BAD) regulującego

proces apoptozy [98]. Defosforylacja reszty Ser112 w białku BAD jest związana z ponownym przemieszczeniem BAX do mitochondriów, uwalnianiem cytochromu c i apoptozą [97]. Badania wykazały również, że hamowanie glikolizy przez 3-BrPA skutecznie zabija komórki raka okrężnicy linii HCT116 i komórki chłoniaka (linia komórkowa Raji) w środowisku hipoksji, w którym komórki wykazują wysoką aktywność glikolityczną i zmniejszoną wrażliwość na czynniki przeciwnowotworowe, w tym taksol, doksorubicynę, trójtlenek arsenu czy winkrystynę [97]. Jednakże Kunjithapatham i wsp. [99] wykazali, że 3-BrPA nie przekracza bariery krew-mózg, która nie jest przeszkodą dla 2-DG, dlatego 2-DG, ale nie 3-BrPA jest kandydatem na lek w terapii nowotworów mózgu.

1.4. Aktywność biologiczna 2-DG

2-DG jest syntetycznym analogiem glukozy, którego grupa hydroksylowa przy węglu w pozycji C2 została podstawiona atomem wodoru. Struktura chemiczna 2-DG została przedstawiona na Rycinie nr 5.



Rycina 5. Porównanie struktury chemicznej D-glukozy i 2-Deoksy-D-glukozy [41].

Ponieważ struktura cząsteczki glukozy i mannozy różni się jedynie orientacją grupy hydroksylowej w pozycji C2, jej podstawienie przez wodór czyni cząsteczkę 2-DG równocześnie analogiem mannozy.

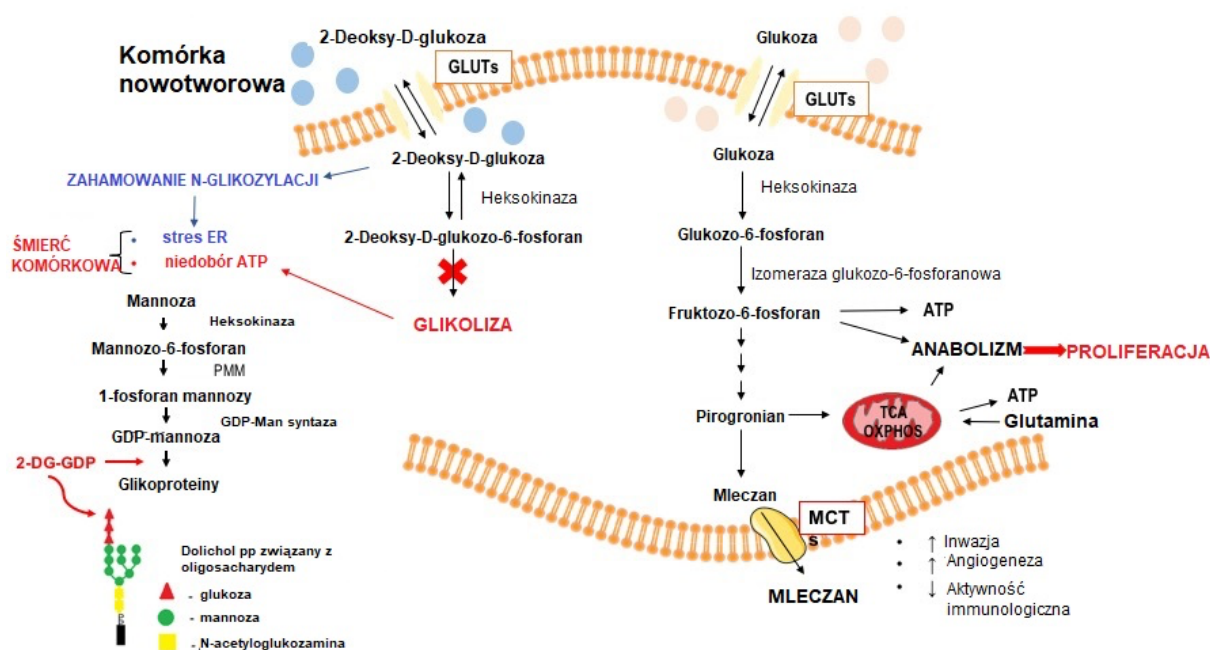
Ze względu na wysokie podobieństwo do struktury glukozy, 2-DG ma zdolność przenikania przez BBB. Transport do wnętrza komórki odbywa się głównie z wykorzystaniem transporterów glukozy GLUT1 oraz GLUT4 (dyfuzja wspomagana) ale częściowo również poprzez transport aktywny wykorzystując kotransporter glukozowo-sodowy (ang. *sodium-*

glucose co-transporter, SGLT) [100,101]. 2-DG konkurencyjnie hamuje wychwyt glukozy, ponieważ oba związki są transportowane tą samą drogą.

Wewnątrz komórki 2-DG wykazuje szereg efektów biologicznych [102]. 2-DG jest przede wszystkim inhibitorem glikolizy, lecz poza obniżaniem poziomu ATP powoduje także intensyfikację stresu oksydacyjnego [102]. W efekcie niedoboru energii komórki aktywują proces autofagii oraz apoptozy. Z kolei jako analog mannozy, 2-DG zaburza proces N-glikozylacji białek [102].

1.4.1. Wewnątrzkomórkowy metabolizm 2-DG - hamowanie glikolizy

Wewnątrz komórki cząsteczka 2-DG jest fosforylowana przez HK do 2-deoksy-D-glukozy-6-fosforanu (2-DG-6-P), który ze względu na brak grupy -OH nie jest w stanie izomeryzować do fruktozy-6-fosforanu, a w konsekwencji nie ulega dalszym przekształceniom w procesie glikolizy. 2-DG-6-P akumuluje się w komórce, niekompetycyjnie blokując HK II oraz kompetycyjnie blokując kolejny enzym tego szlaku - PGI [102-104]. 2-DG blokuje metabolizm glukozy na wczesnym etapie zakłócając zarówno proces glikolizy jak i oksydacyjnej fosforylacji [105]. W konsekwencji dochodzi do obniżenia poziomu ATP, zablokowania cyklu komórkowego, zahamowania wzrostu komórek oraz do śmierci komórkowej [106,107]. Porównanie metabolizmu glukozy i 2-DG zostało zobrazowane na Rycinie nr 6.



Rycina 6. Schemat metabolizmu glukozy oraz 2-deoksy-D-glukozy w komórce nowotworowej. 2-DG po wnikięciu do komórki jest fosforylowana do 2-DG-6-P, cząsteczki, która ze względu na brak grupy

-OH nie ulega dalszym etapom glikolizy. Nieefektywna glikoliza prowadzi do niedoboru ATP czego konsekwencją jest śmierć komórki [41].

Należy podkreślić, że hamowanie glikolizy przez 2-DG jest istotnie wyższe w warunkach hipoksji, ze względu na wysoką intensywność procesu i obniżone działanie oddychania mitochondrialnego [41]. Jak wspomniano wcześniej, warunki hipoksji korelują ze zwiększeniem ilości transporterów glukozy oraz zwiększoną aktywnością enzymów biorących udział w metabolizmie glukozy, takich jak HK czy LDH. Zmiany te powodują zwiększony wychwyty 2-DG przez komórki guza co prowadzi do zwiększonej akumulacji 2-DG-6-P i zwiększonego zahamowania glikolizy w stosunku do komórek prawidłowych.

1.4.2. Indukcja autofagii

Zmniejszenie ilości ATP w komórkach prowadzi do zaburzenia stosunku AMP/ATP, co prowadzi do aktywacji i wzrostu stężenia kinazy aktywowanej przez AMP (ang. *AMP-activated protein kinase*, AMPK) [107]. AMPK aktywowana jest allosterycznie przez zwiększony poziom AMP, przy jednoczesnym zmniejszeniu poziomu ATP w komórce [108]. AMPK odpowiada za procesy fosforylacji i inaktywacji enzymów biorących udział w syntezie lipidów oraz cholesterolu, syntezy białek, transkrypcji genów czy biogenezy mitochondriów [109]. Reguluje także wrażliwość tkanek na insulinę i wychwyty glukozy [109]. AMPK odgrywa ważną rolę w kontroli wzrostu, proliferacji i autofagii komórek dzięki regulacji aktywności białka mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin*, mTOR). Kinaza białkowa mTOR składa się z dwóch strukturalnie i funkcjonalnie różnych kompleksów określanych jako TORC1 i TORC2 [110]. mTORC1 aktywuje procesy anaboliczne jak synteza białek, biosynteza nukleotydów hamując jednocześnie procesy kataboliczne jak autofagia [110]. Sygnałami regulującymi aktywność mTORC1 są m.in. czynniki stresogenne (niedotlenienie, uszkodzenia DNA, infekcje wirusowe), hormony i czynniki wzrostu oraz dostępność składników odżywczych [111]. Główną kinazą aktywującą szlak mTOR jest 3-kinaza fosfatidyloinozytolu (ang. *phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K). Aktywowana PI3K aktywuje z kolei kinazę Akt, która fosforylując mTOR hamuje proces autofagii [112]. Z kolei zahamowanie aktywności kinazy mTOR przez AMPK indukuje autofagię [113].

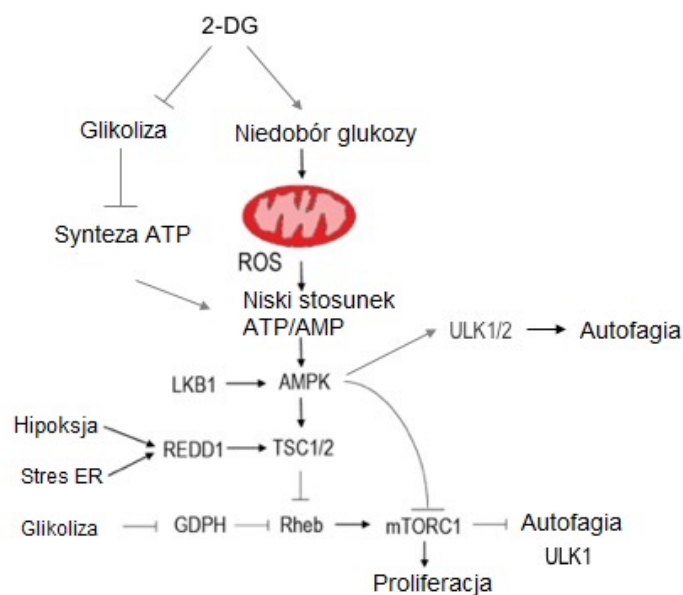
Autofagia jest procesem uniwersalnym, zachodzącym we wszystkich typach komórek, w którym cytoplazmatyczne makrocząsteczki i organelle są kierowane do lizosomów w celu ich degradacji i pozyskania związków do ponownej syntezy organicznej [114]. Mimo, że autofagia została początkowo odkryta jako mechanizm programowanej śmierci komórki typu II, ostatnie dowody wskazują, że autofagia może pełnić także rolę mechanizmu ochronnego

[115-117]. Wyróżnia się trzy rodzaje autofagii: autofagię zależną od białek opiekuńczych, mikroautofagię oraz makroautofagię [118].

Makroautofagię zapoczątkowuje otoczenie fragmentu cytoplazmy przeznaczonego do degradacji przez fagofor, podwójną błonę w kształcie litery C. Błona ta wydłuża się aż do całkowitego zamknięcia w pęcherzyk zwany autofagosomem, w którego wnętrzu zamknięty jest fragment cytoplazmy z białkami lub organelami. Następnie autofagosom dojrzewa, dochodzi do fuzji z lizosomami co skutkuje powstawaniem autofagolizosomów. Obecne w autofagolizosomach enzymy hydrolityczne rozkładają wielkocząsteczkowe struktury uwięzione w pęcherzyku do ich podstawowych składników tj. aminokwasów i kwasów tłuszczowych [119-121]. Produkty degradacji autofagosomalnej, takie jak cukry, nukleotydy, aminokwasy i kwasy tłuszczowe, mogą być transportowane z powrotem do cytoplazmy, w celu ponownego włączenia do metabolizmu komórkowego. Jednakże wydłużony okres trwania autofagii może prowadzić do nadmiernej degradacji składników komórkowych niezbędnych do przetrwania (takich jak mitochondria), powodując śmierć komórki [122].

W przypadku komórek nowotworowych autofagia pełni podwójną rolę, a jej znaczenie jest różne w zależności od etapu rozwoju nowotworu [123]. Autofagia może zarówno zapobiegać kancerogenezie poprzez redukcję stanów zapalnych i utrzymywanie stabilności genetycznej [123], jak i chronić komórki, przed stresem komórkowym wywołanym np. chemioterapią [124]. W zaawansowanych nowotworach autofagia zwiększa przeżywalność komórek rakowych, sprzyja przerzutom i wspiera ich lekooporność [125].

Niezależnie od aktywności kinazy mTOR, autofagia może być również indukowana innymi czynnikami, jak zaburzenia glikozylacji lub niedobór glukozy [126,127]. Ponadto Shutt i wsp. [128] wykazali, że niedobór glukozy w komórkach spowodowany obecnością 2-DG jest również w stanie stymulować produkcję ROS i prowadzić do indukcji autofagii, a proces ten może zostać odwrócony w obecności antyoksydantów jak np.: N-acetylo-L-cysteina (NAC) lub katalaza [128]. W modelach *in vitro* wykazano, że 2-DG indukuje autofagię w wielu różnych typach nowotworów [129,130]. Podobne obserwacje opisywano w badaniach klinicznych I fazy u pacjentów z rakiem prostaty lub innym guzem litym [131]. Wpływ 2-DG na indukcję autofagii został przedstawiony na Rycinie 7.



Rycina 7. Molekularne ścieżki indukcji autofagii przez 2-DG. Główną konsekwencją zahamowania glikolizy jest niedobór ATP, który zaburza stosunek ATP/AMP. W rezultacie aktywowany jest AMPK, który bezpośrednio fosforyluje białko TSC1 z kompleksu białka mTOR co prowadzi do indukcji autofagii. Ponadto, niedobór glukozy spowodowany obecnością 2-DG stymuluje produkcję reaktywnych form tlenu (ROS) w mitochondriach, co również aktywuje AMPK i indukuje autofagię [41].

1.4.3. Indukcja apoptozy

Przedłużający się proces autofagii i rozległa degradacja wewnątrzkomórkowa mogą ostatecznie doprowadzić do wewnętrznej, apoptotycznej śmierci komórkowej [132].

Apoptoza jest procesem mającym na celu utrzymanie równowagi między wytwarzaniem nowych, a eliminacją starych, uszkodzonych lub zmutowanych komórek. Jest to proces aktywny, będący efektem końcowym wielu szlaków sygnałowych i wymagający do przebiegu syntezy RNA i białek [133]. Powstawanie ognisk nowotworowych wynika nie tylko z akumulacji mutacji w poszczególnych genach, ale również z unikania apoptozy przez komórki guza. Jest to zatem bardzo ważny aspekt kancerogenezy [133].

W zależności od typu sygnału komórkowego (uszkodzenie DNA, niedobór czynników wzrostu lub szok termiczny) inicjacja apoptozy może przebiegać dwoma różnymi szlakami - wewnątrzpochodnym lub zewnątrzpochodnym. Nazywane są one odpowiednio szlakiem mitochondrialnym oraz szlakiem receptorów śmierci [134]. Oba szlaki mogą prowadzić do aktywacji kaspaz, które są odpowiedzialne za efektorową fazę apoptozy [135].

Proces apoptozy wewnątrzpodchodnej jest regulowany przez grupę białek anty- i proapoptotycznych, w tym białek z rodziny Bcl-2 [136]. Wykazano, że białka antyapoptotyczne jak Bcl-xL, Bcl-2 i Mcl-1 blokują aktywność proapoptotycznych białek rodziny Bcl-2: Bax i Bak [137]. Z kolei białka Bcl-2, BH3-only mogą zarówno aktywować proapoptotyczne białka jak Bax, jak i neutralizować antyapoptotyczne białka w odpowiedzi na stres komórkowy [137]. Do aktywatorów białek proapoptotycznych należą: Bim, Bad, Bik, Noxa, Puma, Hrk, Bmf, Mule, Bcl-g i inne [137]. Aktywność białek proapoptotycznych może prowadzić do spadku potencjału błony mitochondrialnej, co skutkuje uwolnieniem do cytozolu m.in. cytochromu c [138]. Cytochrom c łączy się z prokaspazą-9 tworząc apoptosom. Aktywna kaspaza-9 aktywuje kaskadę kaspaz degradujących komórkę [139].

Jak wskazują doniesienia literaturowe, apoptoza komórek nowotworowych indukowana przez 2-DG przebiega szlakiem wewnątrzkomórkowym [106,140,141]. Według Ramirez-Peinado [140], 2-DG indukuje ekspresję białek proapoptotycznych z rodziny Bcl-2 jak Noxa i Bim, zmniejszając poziom białek antyapoptotycznych Mcl-2 i Bcl-xL [140]. Co ważne, dodanie mannozy znosiło zmiany ekspresji białek indukowane przez 2-DG w tych białkach wskazując, że to stres związany z ER (ang. *endoplasmic reticulum*, retikulum endoplazmatyczne) jest podstawowym mechanizmem inicjacji apoptozy [140]. Z kolei w komórkach chłoniaka T-komórkowego traktowanego 2-DG, indukcja apoptozy korelowała ze zmianami ekspresji białek Bim i Bmf [106]. Valera i wsp. [141] również zaobserwowali, że traktowanie 2-DG komórek raka pęcherza moduluje stosunek białka Bcl-2/Bax indukując apoptozę [141]. Należy zatem przypuszczać, że udział poszczególnych białek z rodziny Bcl-2 w indukcji apoptozy jest zależny od rodzaju badanych komórek.

Munoz-Pinedo i wsp. [142] wykazali, że zmniejszony poziom ATP przez 2-DG uwrażliwia także komórki na apoptozę zewnętrzną poprzez wiązanie ligandów białek z rodziny czynników martwicy nowotworowej, TNF (ang. *tumor necrosis factor*). Zhang wraz z zespołem [143] wykazali, iż komórki traktowane 2-DG charakteryzują się znacznie obniżonym poziomem antyapoptotycznego białka cFLIP (ang. *FLICE inhibitory protein*), hamującego wiązania prokaspazy 8 oraz białka RIP (ang. *receptor interacting protein*, białko oddziałujące z receptorem), co uwrażliwiało na indukcję apoptozy przez cytokinę TRAIL (ang. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) [143].

1.4.4. Udział 2-DG w N-glikozylacji białek

W latach 70' Schwarz i wsp. [144] wykazali, że 2-DG jest również analogiem mannozy. Cząsteczka mannozy różni się od glukozy jedynie położeniem grupy hydroksylowej na drugim

atomie węgla (czyli jest jej epimerem), co, jak postulują niektórzy autorzy, w warunkach normoksji czyni ją lepszym substratem dla N-glikozylacji białek [145]. Mannoza konieczna do glikozylacji wnika do komórek za pomocą transporterów GLUT a jej przemiany są zapoczątkowane przez heksokinazę [146]. Ponadto, mannoza może także być syntetyzowana z przemian glukozy [147], zatem hamowanie glikolizy ogranicza także jej dostępność w komórce.

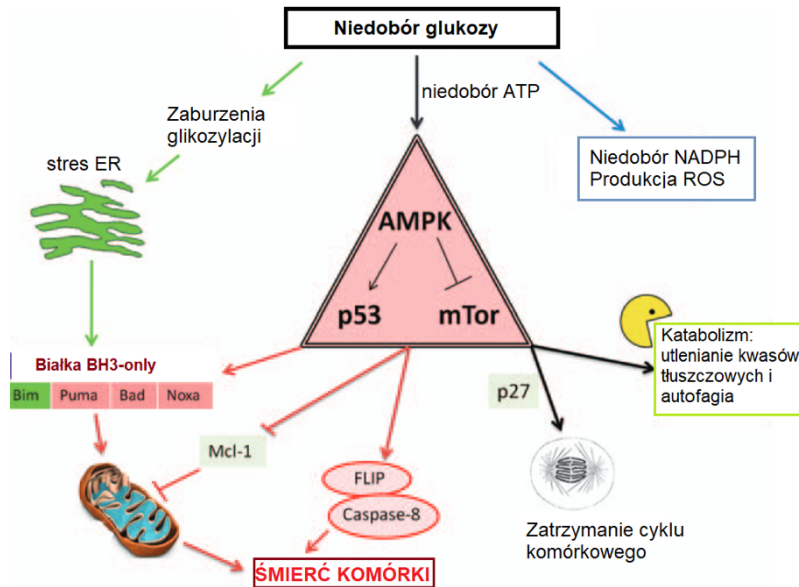
Wewnątrz komórki cząsteczka mannozy jest fosforylowana przez heksokinazę do 6-fosforanu (Man-6-P), który jest substratem dla trzech konkurujących ze sobą enzymów [146]. Man-6-P może być katabolizowany przez izomerazę fosfomannozy (MPI) lub kierowany do N-glikozylacji przez fosfomannomutazę (PMM2). Drugi szlak wykorzystuje mannozę do syntezy kwasu 2-keto-3-deoksy-D-glicero-D-galakto-nononowego (KDN) - cząsteczki spokrewnionej z kwasem sialowym. Metabolizm mannozy jest określany przez stosunek MPI/PPM2 w komórce. Wyższe wartości MPI sprzyjają katabolizmowi, podczas gdy niższy stosunek MPI do PMM2 sprzyja N-glikozylacji [146]. PMM2 przekształca Man-6-P w Man-1-P (mannozo-1-fosforan), który jest następnie włączany do kilku produktów pośrednich glikozylacji, takich jak GDP-Man, GDP-fukoza i fosfodolichol mannozy (Dol-P-Man), które dodatkowo przyczyniają się do N- lub O-glikozylacji [147]. Schematyczne przedstawienie metabolizmu mannozy ilustruje Rycina 6.

N-glikozylacja jest najczęstszą modyfikacją potranslacyjną białek [148]. Reakcja N-glikozylacji polega na przyłączeniu reszty cukru do atomu azotu łańcucha bocznego reszty aminokwasowej w białkach [149] i przebiega w ER oraz w aparacie Golgiego [149]. N-glikany przyłączone potranslacyjnie do białek zapewniają stabilizację i prawidłowe fałdowanie białek, prawidłowe interakcje i przekazywanie sygnałów wewnątrzkomórkowych oraz adhezję komórek [150]. Zaburzenia glikozylacji prowadzą do nieprawidłowego fałdowania białek i ich zatrzymywania w ER. Skutkuje to aktywacją odpowiedzi niepofałdowanych białek UPR (ang. *unfolded protein response*), czyli stresem ER i apoptozą komórkową [126].

Ahadova i wsp. [151] wykazali, że małe dawki 2-DG powodują natężenie wbudowywania mannozy do glikoprotein komórkowych. Z drugiej strony wysokie stężenia 2-DG doprowadzają do znacznego zmniejszenia lub całkowitego wyeliminowania mannozy, czemu towarzyszy znaczące zahamowanie syntezy białek [151]. 2-DG zmniejsza zatem pulę dostępnej mannozy, a z pozostałą konkuruje o tworzenie oligosacharydów połączonych z lipidami LLO (ang. *lipid-linked oligosaccharides*), które są prekursorami ugrupowań cukrowych w glikoproteinach [152] LLO są syntetyzowane poprzez stopniowe przenoszenie mannozy ze związanego z nią kowalencyjnie nośnika (GDP lub dolichol) na N-acetylo-

cząsteczki glukozy [152]. Podczas łączenia N-połączonych oligosacharydów z białkami 2-DG jest przekształcany do 2-DG-GDP w wyniku kowalencyjnej reakcji z GDP lub dolicholem [153]. Ponadto konwersja 2-DG-GDP prowadzi do wyczerpania prekursora tworzącego łańcuch, który przeszkadza w tworzeniu oligosacharydów i zaburza syntezę glikoprotein [154]. Zaburzenie syntezy LLO prowadzi do nieprawidłowej N-glikozylacji i fałdowania białek. W pracy dotyczącej wpływu 2-DG na glikoproteiny wirusowe wykazano, że dodanie egzogennej mannozy może odwrócić wpływ 2-DG na syntezę LLO [155]. Z kolei Xi i wsp. [154] wykazali, że 2-DG indukuje autofagię, aktywuje stres ER i zmniejsza poziom ATP, podczas gdy dodatek egzogennej mannozy zapobiega pierwszym dwóm efektom, ale nie wpływa na poziom ATP. Ponadto wykazano, że inny analog glukozy, 2-fluorodeoksy-D-glukoza (2-FDG), który według doniesień jest silniejszym inhibitorem glikolizy niż 2-DG [156,157], był nieskuteczny w zaburzaniu syntezy LLO i N-glikozylacji [154].

Podsumowując, cytotoksyczność 2-DG jest determinowana przede wszystkim hamowaniem procesu glikolizy, którego konsekwencje, jak postuluje Leon-Annicciarico i wsp. [158], są zależne od dostępności tlenu w środowisku komórkowym [158]. W normoksji, cytotoksyczny efekt 2-DG spowodowany jest przede wszystkim indukcją stresu ER [102], podczas gdy w warunkach hipoksji 2-DG upośledza metabolizm komórkowy poprzez zmniejszenie o 50% ilości NADPH, ograniczając syntezę ATP, zaburzając proliferację, oraz naprawę DNA [159]. Zmiany komórkowe zachodzące pod wpływem niedoboru glukozy zostały przedstawione na Rycinie 8. Co najważniejsze, wszystkie wymienione powyżej zmiany obserwowane są w większym nasileniu w komórkach nowotworowych, bez istotnego wpływu na żywotność komórek prawidłowych [160].



Rycina 8. Schematyczna ilustracja procesów komórkowych indukowanych w warunkach niedoboru glukozy- hamowanie metabolizmu glukozy powoduje katabolizm, zatrzymanie cyklu komórkowego lub śmierć komórkową [161].

1.5. 2-DG uwrażliwia komórki na chemio i radioterapię

Liczne badania wykazały, iż hamowanie glikolizy nie tylko jest mechanizmem cytotoxyczności, ale także korzystnie moduluje odpowiedź komórek na działanie innych czynników przeciwnowotworowych, w tym leków i radioterapii. Postuluje się, iż 2-DG upośledza zdolność komórek do naprawy uszkodzeń spowodowanych lekami [141]. Indukowane 2-DG obniżenie poziomu ATP może zaburzać działanie zależnych od ATP białek błonowych oporności wielolekowej MDR (ang. *multidrug resistance*, MDR), które mają zdolność aktywnego usuwania cytostatyków poza komórkę [162]. Ponadto, jak wcześniej wspomniano, 2-DG hamuje ekspresję białek apoptotycznych, ułatwiając tym samym indukcję procesu apoptozy [140]. Wykazano, iż 2-DG reguluje poziom aktywności białek p53, Mcl-1, PUMA, Noxa i Bad, które korelują z wrażliwością komórek nowotworowych na chemioterapię [163].

Mechanizm wspomagania efektów cytotoxycznych leków poprzez zastosowanie 2-DG został dotychczas dobrze udokumentowany w modelach wielu typów nowotworów. Między innymi Valera i wsp. [141] wykazali, iż 2-DG uwrażliwia komórki na doksorubicynę, cisplatynę i gemcytabinę, które stosowane samodzielnie były nietoksyczne [141]. Z kolei w modelu raka trzustki 2-DG uwrażliwiła komórki na 5-Fluorouracyl (5-FU) [164]. Inne

przykładowe badania terapii skojarzonych 2-DG z dostępnymi cytostatykami zostały podsumowane w Tabeli 1.

Tabela 1. Zastosowanie 2-DG w terapii skojarzonej – przykłady badań przedklinicznych i klinicznych [41]

Terapia skojarzona z 2-DG	Rodzaj nowotworu	Piśmiennictwo
Cisplatyna	- rak szyi i głowy - GBM - rak pęcherza	[165] [166] [141]
Docetaxel	- rak piersi, - rak płuc - rak szyi i głowy	[160]
Metformina	- rak piersi - chłoniak komórek B - rak jajnika - GBM	[167] [168] [169] [170]
NCL-240	- czerniak - rak płuc - rak jajnika - rak piersi	[171]
Doksorubicyna	- rak brodawkowy tarczycy - rak piersi - rak pęcherza	[172] [173] [141]
Daunorubicyna	- rak jelita grubego - rak piersi	[174]
Gemicytabina	- rak pęcherza	[141]
Sorafenib	- rak brodawkowy tarczycy - rak wątrobowo-komórkowy	[172] [175] [176]
Adriamycyna	- kostniako-mięsak - niedrobnokomórkowy rak płuc	[177]
Barasertib i Everolimus	- białaczka	[159]
Paclitaxel	- kostniako-mięsak - niedrobnokomórkowy rak płuc	[177]
Salirasib	- rak trzustki	[178]
Berberyna	- rak płuc	[179]
Fenofibrat (FF)	- rak piersi - czerniak - kostniakomięsak	[180]
Resweratrol	- nerwiak zarodkowy	[181]
Mito-Q, Mito-CP, Dec-TPP+	- rak płuc	[182]

Metylprednizolon	- chłoniak nieziarniczny	[183]
Bursztynian alfa-tokoferylu	- gruczolakorak okrężnicy - rak szyjki macicy - gruczolakorak płuc	[184]
Afatinib	- niedrobnokomórkowy rak płuc	[107]
Oligomycyna	- drobnokomórkowy rak płuc - GBM	[185] [186]
Bevacizumab	- GBM	[187]
5'-Fluorouracyl	- rak trzustki	[164]
Trastuzumab	- rak piersi	[188]
Dehydroepiandrosteron (DHEA)	- rak piersi - rak prostaty	[189]
Kwas ferulowy z napromienianiem	- niedrobnokomórkowy rak płuc	[190]
Radioterapia	- GBM - rak piersi - rak prostaty - rak szyjki macicy	[191] [192] [193] [194]

Kolejne badania wskazują, iż 2-DG uwrażliwia komórki nowotworowe również na radioterapię [191]. Promieniowanie jonizujące (IR) w leczeniu raka prowadzi do uszkodzenia komórek poprzez produkcję wolnych rodników oraz pękania wiązań chemicznych w kwasach nukleinowych. Mechanizm ten powoduje dalsze uszkodzenia oksydacyjne w kwasach nukleinowych oraz białkach, co skutkuje śmiercią komórek [194]. Jednakże, w wyniku selekcji klonalnej, komórki nowotworowe nabywają oporności na uszkadzające działanie promieniowania i unikają z czasem eliminacji [193]. Wiadomo też, że oporność na promieniowanie jest skorelowana z hipoksją i glikolitycznym metabolizmem guza [193]. Dzieje się tak, gdyż niedobór tlenu ogranicza produkcję ROS, zapobiegając uszkodzeniom DNA powodowanym przez promieniowanie [195]. Analizując wpływ 2-DG na uwrażliwianie komórek rakowych na radioterapię odnotowano zmiany w ekspresji wielu genów zaangażowanych w mechanizmy naprawy DNA i apoptozę, regulatorów transkrypcji, sygnalizacji komórkowej i inne, które mogą znacząco wpływać na radiouwrażliwienie guza [196]. Zauważono również duże rozbieżności w zależności od typu komórek nowotworowych efektów oddziaływania 2-DG w odpowiedzi na promieniowanie. Sugeruje to istotny udział innych niż hamowanie glikolizy, mechanizmów cytotoksyczności 2-DG, m.in.: poziomu białek pro- i antyapoptotycznych (c-Myc, Ras, p53, p21, stosunek Bcl-2/Bax i inne), oraz zaburzeń związanych ze stresem oksydacyjnym [196]. Stwierdzono, że stopień uwrażliwienia na

promieniowanie wywołany przez 2-DG w wielokomórkowych sferoidach nowotworowych generowanych z linii ludzkiego glejaka (GBM) był prawie 2,5 krotnie wyższy niż w kulturach monowarstwowych co korelowało ze zwiększoną glikolizą tych pierwszych oraz z synergia między endogennym stresem oksydacyjnym nowotworów, a indukowanym metabolicznie stresem oksydacyjnym [197]. 2-DG prowadzi do obniżenia poziomu ATP we wszystkich liniach komórkowych, jednak obserwacje Dwarakanath i wsp. [196] pozwalają stwierdzić, że to spadek produkcji ATP poniżej pewnego poziomu krytycznego, wpływa na zakres uwrażliwiania komórek nowotworowych na radioterapię. Uważa się, że 2-DG nasila uszkodzenia generowane promieniowaniem i chemioterapią selektywnie w komórkach nowotworowych, ze względu na ich większą zależność od procesu glikolizy, co widoczne jest zwłaszcza w przypadku GBM [196-198].

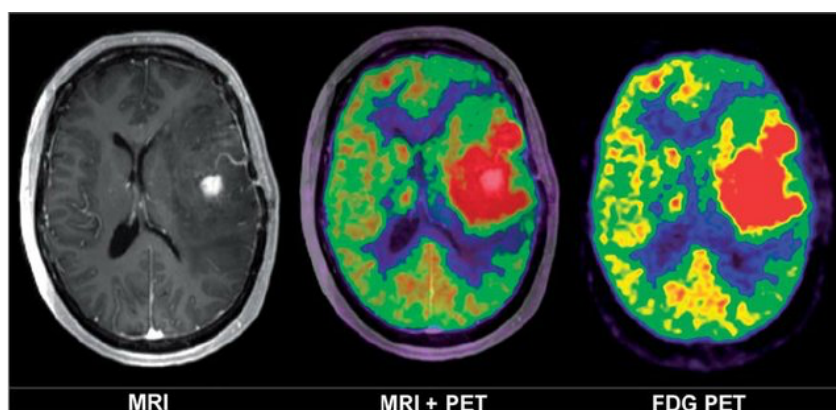
2-DG było dotychczas testowane w wielu badaniach klinicznych, które nie wykazały istotnej toksyczności 2-DG [90,131,177,199,200]. Opisywane efekty 2-DG dotyczyły wpływu badanego związku na zahamowanie wzrostu oraz zmniejszanie rozmiarów guzów. Jednakże efekty przeciwnowotworowe nie były wysoce istotne i ostatecznie 2-DG nie uzyskała rejestracji jako lek. Przyczyną braku efektywności terapeutycznej 2-DG okazały się słabe właściwości farmakokinetyczne cząsteczki. Krótki czas połowicznego rozpadu cząsteczki powoduje, że jest ona szybko eliminowana z krwi pacjenta. Według Hansena i wsp. [201] po podaniu 50 mg/kg masy ciała pacjenta, okres półtrwania 2-DG wynosił 48 minut. Ponadto konieczne jest stosowanie wysokich stężeń (około 5 mM), aby 2-DG mogła efektywnie konkurować z wysoką dostępnością glukozy we krwi [202]. W konsekwencji nie jest możliwe osiągnięcie wysokich stężeń terapeutycznych 2-DG w komórkach nowotworowych pacjenta. Istnieje zatem uzasadniona potrzeba zmodyfikowania cząsteczki 2-DG tak, aby poprawić jej właściwości farmakokinetyczne oraz zmniejszyć stężenie terapeutyczne, co pozwoli w pełni wykorzystać potencjał pochodnych glukozy.

1.6. Charakterystyka halogenopochodnych 2-DG

1.6.1. Znaczenie 2-Fluoro-D-glukozy (2-FG) w diagnostyce nowotworów

Pozytonowa tomografia emisyjna (ang. *positron emission tomography*, PET) jest rutynowo stosowaną techniką diagnostyczną ognisk guzów, określania ich stadium oraz monitorowania odpowiedzi na leczenie w wielu typach nowotworów. Technika PET opiera się na akumulacji znakowanego radioaktywnie fluoro analogu glukozy - ^{18}F -DG wewnątrz komórek nowotworowych w wyniku zwiększonego wychwytu glukozy i natężenia procesu glikolizy [203]. Ponadto, dzięki zdolności swobodnego przekraczania BBB, 2-DG i jej analogi mają

zastosowanie jako znaczniki w diagnostyce guzów mózgu [204]. Wewnątrz komórek ^{18}F -DG jest przekształcany do ^{18}F -DG-6-fosforanu, który podobnie jak 2-DG nie może ulec dalszej izomeryzacji i gromadzi się w komórkach, pozwalając na identyfikację radionuklidu [205]. Przykładowy obraz badania z wykorzystaniem pochodnych 2-DG przedstawia Rycina 9.



Rycina 9 Wychwył ^{18}F -DG przez guz w PET pacjenta chorego na GBM. Na zdjęciach przedstawiono TK bez podania kontrastu (po lewej), tomografia komputerowa zarejestrowana w badaniu PET po podaniu pacjentowi 17mCi ^{18}F -DG (po prawej), oraz połączenie obydwu technik na zdjęciu środkowym [206].

1.6.2. Właściwości przeciwnowotworowe nowych halogenopochodnych 2-DG

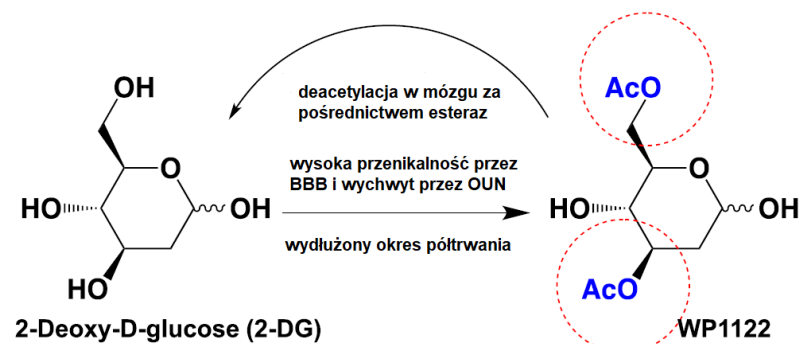
Potencjał diagnostyczny analogów 2-DG jest powszechnie wykorzystywany w badaniach pacjentów. Jednakże strategia terapeutycznego hamowania metabolizmu komórek nowotworowych przez 2-DG nie została dotychczas zakończona powodzeniem. Jak wspomniano powyżej, przyczyną niepowodzeń są niewystarczające właściwości farmakokinetyczne 2-DG i jej szybka degradacja z organizmu oraz niska retencja w tkankach docelowych [201]. Zespół Profesora Waldemara Priebe (MD Anderson Cancer Center, Teksas, USA) opracował syntezę nowych halogenopochodnych 2-DG, w celu weryfikacji czy modyfikacja struktury 2-DG może korzystnie wpłynąć na farmakokinetyczne właściwości cząsteczki i stwarzać możliwość jej dalszego rozwoju w terapii. Eksperymenty kinetyczne wykazały, że zastąpienie grupy hydroksylowej innym halogenem przy węglach C3, C4 oraz C6 zmniejszają wiązanie cząsteczki do HK w komórkach drożdży [207]. Jediną modyfikacją, która nie powoduje utraty wiązania do HK jest modyfikacja przy węglu C2 [207]. Podstawienie grupy hydroksylowej przy C2 halogenkiem doprowadziło do powstania szeregu biologicznie aktywnych pochodnych glukozy, w tym m.in. tj. 2-fluoro-2-deoksy-D-glukozy (2-FG), 2-fluoro-2-deoksy-D-mannozy (2-FM), 2,2-difluoro-2-deoksy-D-glukozy (2,2-diFG), 2-jodo-2-deoksy-D-glukozy (2-IG), 2-jodo-2-deoksy-D-mannozy (2-IM), 2-chloro-2-deoksy-D-glukozy

(2-CM), 2-chloro-2-deoksy-D-mannozy (2-CM), 2-bromo-2-deoksy-D-glukozy (2-BG), oraz 2-bromo-2-deoksy-D-mannozy (2-BM). W celu wyłonienia związku o lepszych właściwościach niż 2-DG, nowe pochodne zostały poddane przeze mnie szczegółowej analizie fizykochemicznej oraz biologicznej.

1.6.3. Inne modyfikacje 2-DG jako strategia poprawy ich właściwości przeciwnowotworowych – acetylacja

Zespół Profesora Waldemara Priebe opracował także metody syntezy nowych acetylowanych pochodnych 2-DG. Acetylacja jest modyfikacją chemiczną, która istotnie wpływa na właściwości farmakokinetyczne leków, czego przykładem są odmienne właściwości morfiny i jej acetylowanej pochodnej - heroiny. Penetracja morfiny do komórek ośrodkowego układu nerwowego (OUN), ulega 100-krotnemu zwiększeniu dzięki obecności dwóch grup acetylowych w cząsteczce heroiny [208,209]. Ponadto, przepuszczalność bariery krew-mózg dla małych cząsteczek rośnie wykładniczo wraz ze zmniejszeniem liczby wiązań wodorowych [210, 211]. Heroina, jako acetylowana w pozycjach C3 i C6 pochodna morfiny, wykazuje lepsze właściwości farmakokinetyczne – dłuższy czas połowicznego rozpadu oraz wyższą retencję w komórkach OUN. Wewnątrz komórek docelowych OUN, obecność esteraz katalizuje deacetylację heroiny do morfiny, która akumuluje się w komórkach mózgu.

Analogiczna do opisanej powyżej modyfikacja 2-DG doprowadziła do syntezy szeregu acetylowanych pochodnych 2-DG, z których do dalszych badań została skierowana 3,6-di-O-acetylo-2-deoksy-D-glukoza (WP1122). Badania wstępne wykazały, iż WP1122 poza transportem przez transportery GLUT przenika do wnętrza komórek także na drodze dyfuzji biernej, co pozwala na uzyskanie wysokich stężeń związku wewnątrz komórek. Zakładamy, iż w komórkach docelowych obecność esteraz usuwających grupy acetylowe pozwoli na uwolnienie wysokiego stężenia 2-DG i jej efektywne oddziaływanie cytotoksyczne. Pozycję grup acetylowych w strukturze cząsteczki WP1122 ilustruje Rycina 10.



Rycina 10. Acetylacja 2-DG w pozycji C3 i C6 prowadzi do uzyskania cząsteczki znacznie lepiej penetrującej barierę krew-mózg, a także charakteryzującej się lepszym wychwytem przez komórki i wydłużonym okresem półtrwania w stosunku do wyjściowego związku [212].

Biorąc pod uwagę opisaną powyżej konieczność poszukiwania nowych, selektywnych terapii przeciwnowotworowych w leczeniu glejaka, a także potencjał, który stwarza hamowanie mechanizmu glikolizy oraz unikalne właściwości 2-DG, należy kontynuować badania nad poprawą jej farmakokinetyki. Wydaje się, że podstawienie wodoru przy węglu nr 2 (C2) halogenkiem, analogicznie jak w wykorzystywanej w diagnostyce 2-FG, bądź też acetylacja 2-DG może wzmocnić potencjał przeciwnowotworowy związku i wyłonić kandydata/kandydatów na leki w terapii GBM.

2. Cel pracy

Celem pracy była analiza porównawcza cytotoksycznego oddziaływania nowych halogenopochodnych 2-DG (2-FG, 2,2-diFG, 2-IG, 2-BG, 2-CG) oraz identyfikacja molekularnych mechanizmów ich oddziaływania w komórkach glejaka wielopostaciowego linii U-251 i U-87.

Do szczegółowych celów badawczych należało:

1. Identyfikacja pochodnych 2-DG o najwyższym potencjale przeciwnowotworowym.
2. Analiza znaczenia położenia podstawnika halogenowego przy węglu C2 w strukturze halogenopochodnych glukozy i mannozy dla efektów ich oddziaływania.
3. Ocena hamowania aktywności heksokinazy II przez pochodne 2-DG.
4. Próba uzyskania rekombinowanego białka heksokinazy II oraz jego krystalizacja wraz z oddziałującą halogenopochodną, w celu oceny różnic w interakcji z enzymem w zależności od rodzaju halo-podstawnika.

3. Materiały i metody

3.1. Badania na modelu in vitro – hodowla komórek eukariotycznych

3.1.1. Linie komórkowe

Badania in vitro wykonane zostały na dwóch modelowych liniach komórkowych ludzkiego glejaka wielopostaciowego – U-87 oraz U-251. Linie komórkowe pochodziły z banku komórek European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) (Salisbury, Wiltshire, UK).

3.1.2. Pożywki i odczynniki wykorzystywane w hodowli komórkowej

Komórki linii U-87 i U-251 były hodowane w pożywce wzrostowej DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium with phenol red and Glutamax*) z niską [1 g/L] (linia U-87) lub wysoką zawartością glukozy [4,5 g/L] (linia U-251) (Gibco™ - Life Technologies, Grand Island, NY, USA) z dodatkiem 10% (o/o) inaktywowanej bydlęcej surowicy płodowej (ang. *fetal bovine serum*, FBS) (Biowest, Riverside, MO, USA). W pożywce obecna była również mieszanka antybiotyków: penicyliny-streptomycyny [50 ug/mL + 50 µg/mL] (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), amfoterycyny [20 µg/mL] (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) oraz gentamycyny [1 µg/mL] (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Po dodaniu składników pożywka była filtrowana na podciśnieniowych zestawach do filtracji próżniowej Filtermax (TPP, Leeds, UK) i przechowywana w 4°C. W hodowli ciągłej komórek, w celu uzupełniania składników odżywczych, pożywka była wymieniana co 48 godzin, co było poprzedzane płukaniem komórek roztworem soli fizjologicznej buforowanym fosforanami (ang. *phosphate-buffered saline*, PBS) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Roztwór PBS otrzymywano poprzez rozpuszczanie tabletek z dodatkiem jonów Ca²⁺, Mg²⁺ w wodzie dejonizowanej, który następnie był filtrowany.

Podczas pasażowania komórek adherentnych, do ich odklejenia od powierzchni naczynia hodowlanego używano roztworu trypsyny-EDTA [0,25%, o/o] (Thermo Fisher Life Technologies, Waltham, MA, USA). Z kolei do przechowywania komórek podczas głębokiego mrożenia komórek w ciekłym azocie, jako krioprotektant wykorzystywano sterylny dimetylosulfotlenek (DMSO), w stężeniu 10 % w pożywce wzrostowej (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA).

3.1.3. Materiały i sprzęt do hodowli

Wszystkie prace prowadzone na liniach komórkowych były wykonywane w warunkach sterylnych, z wykorzystaniem komory laminarnej BIO130– II BSC (Alpina, Augsburg, Niemcy) z poziomym nawiewem sterylnego powietrza, z zachowaniem zasad pracy

aseptycznej. Hodowle prowadzone były w inkubatorze (Nuair NU-5710E, Leeds, UK) w standardowych warunkach: temperatura 37°C, 5% wysycenia CO₂, 95% wilgotności. Komórki hodowano w sterylnych plastikowych butelkach do hodowli adherentnej z zakrętką z filtrem (Nest Scientific Biotechnology, Jiang Su Sheng, Chiny) o powierzchni 25 cm² i 75 cm² lub, w zależności od doświadczenia, na sterylnych 96-/24-/12-dołkowych płytkach do hodowli adherentnej typu F (Nest Scientific Biotechnology, Jiang Su Sheng, Chiny), lub szalkach Petriego o średnicy 60 lub 100 mm (Nest Scientific Biotechnology, Jiang Su Sheng, Chiny). Jednorazowe sterylne pipety serologiczne o objętości 2, 5 i 10 ml, sterylne probówki typu Falcon 15 i 50 mL oraz sterylne końcówki z filtrem 10, 100 i 1000 µL pochodziły z firmy Nest Scientific Biotechnology (Jiang Su Sheng, Chiny). Do kontroli wzrostu i wyglądu komórek wykorzystywano optyczny mikroskop odwrócony AE-2000T firmy Conbest (Kraków, Polska). Ogrzewanie pożywek hodowlanych oraz odczynników wykorzystywanych do hodowli odbywało się w łaźni wodnej w 37°C (JWE Electronics, Warszawa, Polska). Do wirowania komórek używano wirówki firmy Eppendorf (Saksonia, Niemcy). Bank komórek był przechowywany w ciekłym azocie w dewarze w postaci krioprobówek o objętości 1 mL (Nunc Incorporation, Roskilde, Dania). Aby zapewnić powtarzalność doświadczeń, przed rozsianiem komórek na naczynia hodowlane komórki liczone z wykorzystaniem licznika Countess Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Waltham, MA, USA).

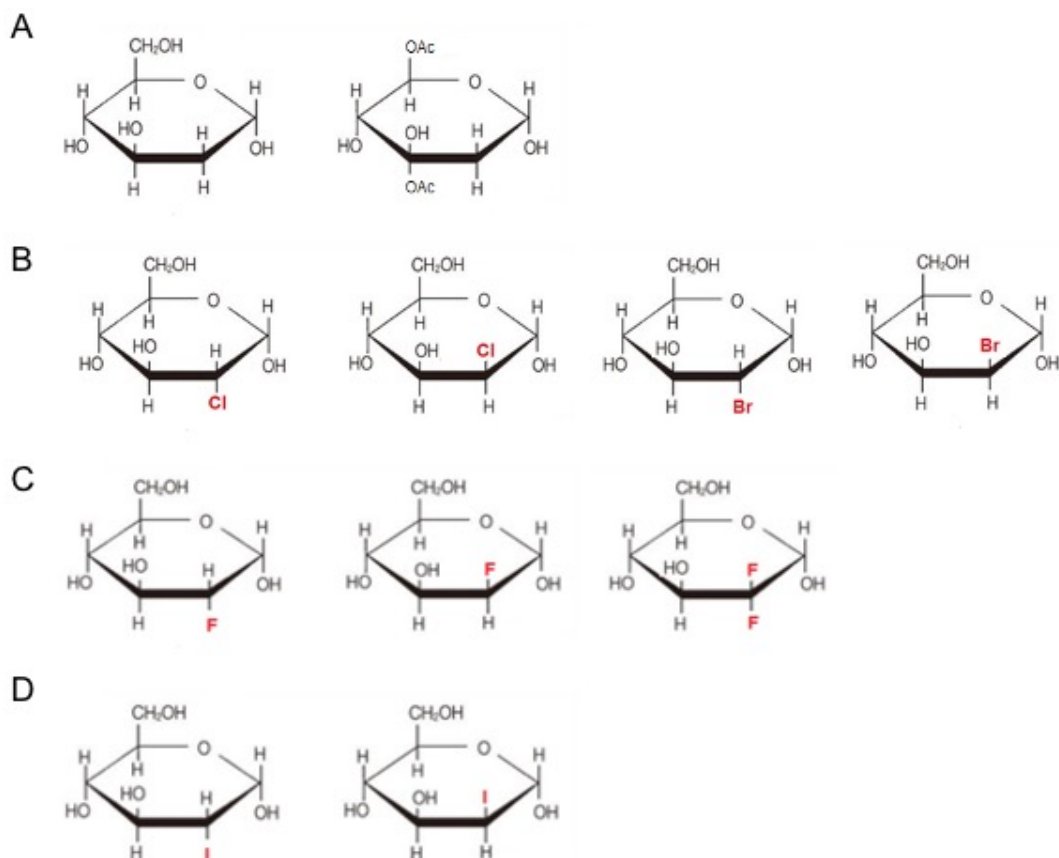
3.1.4. Pasażowanie i zamrażanie komórek

W celu założenia hodowli, krioprobówkę zawierającą komórki wyjmowano z dewaru z ciekłym azotem i ogrzewano przez 5 min. w łaźni wodnej w temperaturze 37°C. Następnie komórki przenoszono do probówki 15 mL zawierającej 4 mL pożywki wzrostowej i wirowano przez 4 min. (1500 rpm) w temperaturze pokojowej (ang. *room temperature*, RT). Następnie usuwano supernatant a pelet zawieszano w 1 mL pożywki wzrostowej. Tak przygotowaną zawiesinę komórkową wysiewano do butelki plastikowej o powierzchni 25 cm² i hodowano w inkubatorze w opisanych wyżej warunkach. Gdy hodowla osiągnęła konfluencję (ok. 3- 4 dnia hodowli) komórki przesiewano do butelki 75 cm². W tym celu przepłukiwano hodowlę buforem PBS (2 mL) ogrzanym do temperatury 37°C, a następnie dodawano 1 mL roztworu trypsyny-EDTA i inkubowano w temperaturze 37°C przez ok. 2-3 min. kontrolując pod mikroskopem stan komórek. Działanie trypsyny neutralizowano poprzez dodanie 2 mL pożywki wzrostowej a następnie całość wirowano przez 4 min. (1500 rpm). Supernatant usuwano, a pelet komórek zawieszano, w zależności od przeznaczenia, w pożywce wzrostowej (do dalszej hodowli), lub w pożywce z dodatkiem 10% DMSO (komórki do zamrożenia w ciekłym azocie). Zawiesinę

komórek w DMSO przenoszono do sterylnych krioprobówek (Nunc Incorporation, Roskilde, Dania) i umieszczano w pojemniku do mrożenia CoolCell LX (Biocision LCC, Larkspur, CA, USA). Pojemnik zapewnia stopniowy spadek temperatury o 1°C/min. co chroni komórki przed fizycznym uszkodzeniem w procesie mrożenia. Pojemnik przechowywano w temperaturze – 80°C przez 24 godziny, a następnie probówki z komórkami umieszczano w dewarze z ciekłym azotem.

3.2. Badane związki

2-deoksy-D-glukoza (2-DG) została zakupiona w Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA). 2-fluoro-2-deoksy-D-glukoza (2-FG), 2-fluoro-2-deoksy-D-mannoza (2-FM), 2,2-difluoro-2-deoksy-D-glukoza (2,2-diFG), 2-jodo-2-deoksy-D-glukoza (2-IG), 2-jodo-2-deoksy-D-mannoza (2-IM), 2-chloro-2-deoksy-D-glukoza (2-CG), 2-chloro-2-deoksy-D-mannoza (2-CM), 2-bromo-2-deoksy-D-glukoza (2-BG), 2-bromo-2-deoksy-D-mannoza (2-BM) oraz acetylowana pochodna 2-DG – 3,6-*di*-O-acetylo-2-deoxy-D-glukoza (WP1122) zostały zsyntetyzowane i przekazane w ramach współpracy naukowej przez Profesora Waldemara Priebe, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA. Struktury chemiczne wszystkich związków przedstawiono na Rycinie nr 11. Jako kontrolę pozytywną indukcji apoptozy w komórkach wykorzystano inhibitor syntezy białek – cykloheksimid (CHX) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA).



Rycina 41. Struktury chemiczne A) 2-DG i WP1122, B) 2-CG, 2-CM, 2-BG i 2-BM, C) 2-FG, 2-FM, 2,2-diFG, D) 2-IG i 2-IM.

50 mM oraz 100 mM roztwory wyjściowe badanych związków sporządzono w wodzie dejonizowanej Milli-Q (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). 50 μ M roztwór wyjściowy CHX przygotowano poprzez rozpuszczenie 50 mg CHX w 3,6 mL DMSO. Przygotowane roztwory filtrowano z użyciem filtra strzykawkowego PES o średnicy porów 0,22 μ m (Chemland, Stargard, Polska) i przechowywano w 4°C.

3.3. Procedury doświadczalne

W opisanych badaniach określano wpływ 72 h inkubacji badanych związków na poszczególne parametry życiowe komórek nowotworowych. Ilość wysiewanych komórek określano za pomocą licznika komórek Countess Automated Cell Counter (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) przy użyciu slajdów Countess Cell Counting Chamber Slides (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Komórki barwiono w stosunku 1:1 stosując 0,4% roztwór błękitu trypanu (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a następnie nakładano 10 μ L na slajd i wprowadzano do licznika. Uzyskaną gęstość przeliczano na gęstość pożądaną i wysiewano na odpowiednie do doświadczenia naczynie

hodowlane. Po 24 h pożywkę wzrostową wymieniano na pożywkę doświadczalną zawierającą odpowiednie stężenia badanego związku i inkubowano przez 72 h w 37°C, 5% CO₂. Wszystkie doświadczenia były wykonywane w co najmniej czterech powtórzeniach technicznych i trzech powtórzeniach biologicznych.

3.3.1. Ocena żywotności komórek z wykorzystaniem testu MTS

Do oceny żywotności komórek wykorzystano test MTS, określający aktywność dehydrogenaz mitochondrialnych. Test MTS jest testem kolorymetrycznym i opiera się na reakcji redukcji soli tetrazolowej przez dehydrogenazy pochodzące z komórek do barwnego formazanu. Żółte zabarwienie soli dodanej do pożywki doświadczalnej i łatwo przenikającej przez błony komórkowe zmienia się w fioletowe pod wpływem mitochondrialnych dehydrogenaz obecnych w żywych komórkach. Intensywność zabarwienia jest zatem proporcjonalna do ilości żywych komórek.

Roztwór roboczy MTS otrzymywano poprzez rozpuszczenie metylosiarczanu fenazy (ang. *phenazine methosulfate*, PMS) [25 µM] (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) w roztworze PBS. Następnie dodawano odczynnik MTS [2 mg/mL] (Promega Biosciences, Madison, WI, USA) i doprowadzano pH do wartości 6,0-6,5. Wszystkie czynności wykonywano chroniąc roztwór przed dostępem światła. W celu zapewnienia sterylności roztwór filtrowano z użyciem filtra strzykawkowego PES o średnicy porów 0,22 µm. Gotowy roztwór przechowywano w -20°C.

Aby wykonać analizę, komórki linii U-87 oraz U-251 w ilości 1,5 x 10⁴/mL wysiewano na płytki 96-dołkowe w objętości 100 µL na dołek. Po upływie czasu inkubacji z badanymi czynnikami, do każdego dołka dodawano 20 µL odczynnika MTS o temperaturze ok. 37°C i inkubowano przez godzinę w 37°C, 5% CO₂. Pomiar absorbancji wykonywano za pomocą czytnika Synergy H1 (BioTek Instruments, Winooski, VE, USA) z oprogramowaniem Gen5, przy długości fali 490 nm. Na podstawie oceny żywotności komórek dla każdego badanego związku wyznaczono wartość IC₅₀ (ang. *half maximal inhibitory concentration*), która określa stężenie eliminujące 50% badanej populacji komórek.

3.3.2. Analiza żywotności komórek w warunkach symulujących warunki hipoksji

Aby ocenić wpływ hipoksji na wrażliwość komórek GBM na pochodne 2-DG stworzono chemicznie warunki symulujące warunki hipoksji. W tym celu wykorzystano DMOG (ang. *dimethylxalylglycine*) (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) - inhibitor hydroksylaz prolylowych w stężeniu 50 lub 100 µM, oraz Rodaminę 123 (Rho123) (Sigma

Aldrich, Saint Louis, MO, USA) w stężeniu 0,25 lub 0,5 μM . Obecność DMOG hamuje rozkład białka HIF-1 α podtrzymując jego aktywność w komórce. Z kolei Rodamina 123 upośledza działanie mitochondriów. Oba związki były dodawane do pożywki 4 h przed rozpoczęciem doświadczenia (przed dodaniem badanych związków) i były obecne w medium aż do jego zakończenia (72 h). Aktywację szlaku HIF-1 α i wzrost ekspresji regulowanych przez niego enzymów, takich jak PDK1 i LDHA, potwierdzono za pomocą techniki Western Blot.

3.3.3. Badanie proliferacji komórek z użyciem testu BrdU

Do oceny natężenia proliferacji komórek poddanych działaniu badanych związków wykorzystano test z bromodeoksyurydyną (BrdU). BrdU jest syntetycznym analogiem tymidyny, który wbudowuje się w nowo zsyntetyzowaną nić DNA komórek proliferujących. Detekcja wbudowanego BrdU następuje za pomocą specyficznego, sprzężonego z enzymem przeciwciała. Następnie reakcja enzymu z chromogennym substratem pozwala na kolorymetryczny pomiar wbudowanego BrdU i ocenę natężenia proliferacji komórek. BrdU Cell Proliferation Kit zakupiono z Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA) i przechowywano w temperaturze 4°C.

Komórki linii U-87 oraz U-251 wysiewano na 96-dółkowe płytki w ilości 1 x 10⁵/mL w objętości 100 μL /dółek. Do kilku dółków wprowadzano pożywkę bez komórek jako układ kontrolny. 20 h przed upływem czasu inkubacji do pożywki doświadczalnej dodawano 20 μL odczynnika BrdU. Do kilku dółków nie dodawano BrdU jako kontroli tła. Po upływie czasu inkubacji usuwano pożywkę, a komórki utrwalano za pomocą 200 μL roztworu utrwalającego (Fixative/Denaturing Solution) pozostawiając na 30 min. w RT. Następnie usuwano roztwór, pozostawiano komórki do wyschnięcia i dodawano 100 μL przeciwciał anti-BrdU (1 h w RT). Po upływie czasu inkubacji przeciwciała usuwano a płytkę przemywano 3-krotnie buforem i pozostawiano do wyschnięcia. Następnie do dółków nakładano po 100 μL przeciwciał IgG anti-mysz sprzężonych z peroksydazą i pozostawiano na 30 min w RT. Po tym etapie powtarzano etap 3-krotnego płukania płytki buforem, a na koniec płytkę płukano wodą dejonizowaną. Po wyschnięciu płytki dodawano 100 μL /dółek roztworu substratu i inkubowano w ciemności przez ok. 15 min. W ostatnim etapie do każdego dółka dodawano 100 μL roztworu zatrzymującego reakcję (Stop Solution). Pomiar absorbancji prowadzono przy długości fali 450 nm (BioTek Instruments, Winooski, VE, USA).

3.3.4. Ocena natężenia syntezy białka w komórkach z wykorzystaniem sulforodaminy

W celu określenia wpływu badanych związków na natężenie syntezy białek w komórkach wykonano test z sulforodaminą B (SRB). SRB, jako anionowy barwnik, wiąże się stechiometrycznie do podstawowych aminokwasów białek komórkowych w lekko zakwaszonym środowisku. Powrót do pierwotnego środowiska pozwala na ekstrakcję barwnika i spektrofotometryczny pomiar absorbancji jego roztworu, dzięki czemu możliwa jest kolorymetryczna analiza natężenia syntezy białek.

Komórki linii U-87 oraz U-251 w ilości $1,5 \times 10^4$ /mL wysiewano na płytki 96-dołkowe w objętości 100 μ L/dołek. Po upływie czasu inkubacji usuwano supernatant i do każdego dołka dodawano 25 μ L zimnego, 50% roztworu kwasu trichlorooctowego (TCA) (POCH, Gliwice, Polska). Płytki inkubowano przez godzinę w 4°C w celu utrwalenia komórek. Następnie płytki przepłukiwano 4-krotnie wodą i pozostawiano do wyschnięcia. W kolejnym etapie do każdego dołka dodawano 50 μ L 0,04% roztworu SRB (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) i pozostawiano na 1 h w RT. Po związaniu barwnika, płytki przepłukiwano 4-krotnie 1% roztworem kwasu octowego (POCH, Gliwice, Polska) i pozostawiano do wyschnięcia. Powstałe kryształy SRB związanego z białkiem rozpuszczano w 50 μ L 10 mM roztworu Tris pH 10,5. Płytki mieszano przez 10 min. a następnie mierzono absorbancję przy długości fali 510 nm (BioTek Instruments, Winooski, VE, USA).

3.3.5. Ocena natężenia glikolizy poprzez ocenę syntezy kwasu mlekowego

Natężenie procesu glikolizy jest wprost proporcjonalne do ilości wydzielanego przez komórki kwasu mlekowego. Aby ocenić wpływ badanych związków na natężenie glikolizy wykorzystano test enzymatyczny Lactate Assay (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Komórki hodowano na szalkach Petriego o średnicy 60 mm. Po upływie czasu inkubacji komórki płukano PBS, a następnie zeszkrobywano za pomocą „skrobaków” (ang. *cell scraper*) (Nunc Incorporation, Roskilde, Dania). Zawieszono w PBS komórki przenoszono następnie do probówek typu Eppendorf (Nest Scientific Biotechnology, Jiang Su Sheng, Chiny) i wirowano w 4°C przez 10 min. (10000 g). Pelety zawieszono w 300 μ L Lactate Assay Buffer i ponownie wirowano w 4°C przez 10 min. (10000 g). Supernatant zbierano znad osadu i nakładano do koncentratorów z filtrem PES 10 kDa MWCO (Pierce, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) w celu usunięcia z próbek dehydrogenazy mleczanowej. Następnie wirowano w 4°C przez 15 min. (8 000 g). Przesącz zbierano i nakładano po 50 μ L/dołek na płytkę 96-dołkową. Następnie do każdego dołka nakładano 50 μ L mieszaniny enzymów Enzyme Mix pochodzącego z kitu i inkubowano przez 30 min w ciemności w RT. Stężenie kwasu mlekowego oznaczano

kolorymetrycznie, poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 570 nm (BioTek Instruments, Winooski, VE, USA).

Natężenie procesu glikolizy zbadano również w medium doświadczalnym uzyskanym po 72 h inkubacji z badanymi związkami. W tym celu medium pobierano z komórek i wprowadzono do koncentratorów z filtrem PES 10 kDa MWCO (Pierce, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) w celu usunięcia z próbek dehydrogenazy mleczanowej. Supernatant wirowano w 4°C przez 15 min. (8000 g). Następnie próbki medium rozcieńczano w buforze Lactate Assay Buffer 1:80, tak aby stężenie mleczanu mieściło się w sporządzonej krzywej standardowej. Rozcieńczone próbki nakładano 50 µL/dołek na płytkę 96-dołkową i dalej przeprowadzano eksperyment analogicznie do analizy lizatów komórkowych.

3.3.6. Ocena aktywności heksokinazy

Do oznaczenia aktywności heksokinazy w lizatach komórkowych wykorzystano Hexokinase Assay Kit (Abcam, Cambridge, UK). Eksperyment ten wykorzystuje zdolność HK II do fosforylacji glukozy do G-6-P, który następnie jest utleniany do NADH. Produkt ten redukuje bezbarwny wskaźnik do kolorowego produktu o wysokiej absorbancji przy długości fali 450 nm. W celu wykonania analizy, komórki hodowano na szalkach Petriego o średnicy 60 mm. Po upływie czasu inkubacji komórki płukano PBS, a następnie zeskrobywano za pomocą skrobaków. Zawieszone w PBS komórki przenoszono następnie do probówek typu Eppendorf (Nest Scientific Biotechnology, Jiang Su Sheng, Chiny) i wirowano w 4°C przez 10 min. (10000 g). Pelety zawieszano w 150 µL zimnego buforu i homogenizowano przez pipetowanie a następnie wirowano w 4°C przez 10 min. (10000 g). Supernatant zbierano do nowych probówek typu Eppendorf. Następnie nakładano po 7 µL (tak aby wynik mieścił się w zakresie krzywej standardowej) próbek na dołki płytki 96-dołkowej i uzupełniano buforem do objętości 50 µL. Przygotowywano również kontrolę negatywną oraz pozytywną. Następnie do wszystkich dołek dodawano 50 µL mieszaniny (34 µL Assay Buffer, 2 µL mix enzymów, 2 µL Developer, 2 µL koenzymu i 10 µL substratu dla HK II). Tak przygotowaną płytkę inkubowano w ciemności w RT przez 10 min., a następnie oznaczano aktywność HK II kolorymetrycznie przy długości fali 450 nm (BioTek Instruments, Winooski, VE, USA).

3.3.7. Ocena indukcji apoptozy poprzez ocenę aktywacji kaspazy 3

Kaspaza-3 jest enzymem z rodziny endoproteaz regulujących szlaki sygnałowe stanów zapalnych i apoptozy. Kaspaza-3 jest określana mianem kaspazy wykonawczej ze względu na jej rolę w koordynowaniu niszczenia struktur komórkowych takich jak fragmentacja DNA lub

degradacja białek cytoszkieletu. Aktywność kaspazy-3 jest ściśle regulowana, produkowana jest w formie nieaktywnego zymogenu. Przeciwciała kaspazy-3 służą jako doskonałe biomarkery do monitorowania indukcji apoptozy poprzez analizę poziomu prokaspazy-3 oraz jej aktywnej formy. W celu określenia aktywności tych kaspaz wykorzystano kolorymetryczny test Caspase Apoptosis Colorimetric Assay (G-Biosciences, Saint Louis, MO, USA).

W celu wykonania anlizy komórki hodowano na szalkach Petriego o średnicy 60 mm. Po upływie czasu inkubacji komórki płukano PBS a następnie zeszkrobano za pomocą skrobaków. Zawieszono w PBS komórki przenoszono następnie do probówek typu Eppendorf (Nest Scientific Biotechnology, Jiang Su Sheng, Chiny) i wirowano w 4°C przez 10 min. (10000 g). Pelety zawieszono w 50 µL buforu lizującego i dokonywano lizy poprzez 5-krotne naprzemienne chłodzenie i ogrzewanie lizatów. Wszystkie odczynniki przed użyciem ogrzewano do temperatury pokojowej. Doświadczenie wykonywano na płycie 96-dołkowej. Do każdego dołka wprowadzano po 50 µL buforu lizującego oraz 50 µL buforu Assay Buffer. Następnie do dołków wprowadzano po 5 µL badanych próbek i 5 µL chromoforu - p-nitroaniliny. Aktywność kaspazy oznaczano kolorymetrycznie, przy długości fali 405 nm po 30 min. inkubacji w RT (BioTek Instruments, Winooski, VE, USA).

3.3.8. Ocena zmian ekspresji białek metodą Western-blot

Procedura otrzymywania lizatów całokomórkowych

Komórki hodowano na szalkach Petriego o średnicy 60 lub 100 mm. Po upływie czasu inkubacji z badanymi związkami komórki płukano PBS, a następnie zeszkrobano za pomocą skrobaków. Komórki zawieszono w PBS przenoszono następnie do probówek typu Eppendorf (Nest Scientific Biotechnology, Jiang Su Sheng, Chiny) i wirowano w 4°C przez 10 min. (10000 g). Supernatant odsysano za pomocą ssaka, a pelety zamrażano i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu zakończenia doświadczeń.

W celu wyizolowania białka z komórek przygotowano bufor o następującym składzie:

Skład buforu RIPA:

- Igepal CA-630 1% (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA)
- dezoksychoLAN sodowy 0,5% (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA)
- SDS 0,1% (ang. *sodium dodecyl sulfate*, siarczan dodecylu) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA)
- PBS (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA)

Bezpośrednio przed użyciem do buforu dodawano inhibitory proteaz:

- aprotyninę [30 $\mu\text{L}/\text{mL}$] (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA)
- ortowanadzan sodowy [1 mM] (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA).

Pelety rozmrażano i zawieszano w 100 μL buforu RIPA z inhibitorami. Ponadto do lizatów dodawano PMSF (*ang. phenylmethylsulfonyl fluoride*) o stężeniu 10 mg/ml i inkubowano przez 30 min. na lodzie. Następnie lizaty odwirowywano w 4°C przez 6 min. (10000 g). Supernatanty przenoszono do nowej probówki typu Eppendorf i zamrażano w -80 °C lub poddawano procedurze oznaczania stężenia białka.

Oznaczanie stężenia białka metodą Bradforda

Lizaty komórkowe w ilości 5 $\mu\text{L}/\text{dołek}$ nakładano na płytkę 96-dołkową. Dodawano 250 μL odczynnika Bradforda (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), a następnie mierzono absorbancję przy długości fali 595 nm (BioTek Instruments, Winooski, VE, USA) [213].

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (Western blot)

Aparaty do elektroforezy oraz do transferu białek na membrany a także membrany i odczynniki zostały zakupione w Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). Wyhodowane na szalkach Petriego (60 lub 100 mm) komórki traktowano badanymi związkami. Po upływie czasu inkubacji komórki zbierano i przeprowadzano lizę zgodnie z procedurami opisanymi powyżej. Stężenie otrzymanego białka oznaczano metodą Bradforda. Materiał przed rozdziałem poddawano denaturacji (5 min, 100°C). Zdenaturowane białko w ilości 35 μg (z dodatkiem 7 μl buforu Laemli) nakładano do zgłębień w 10-15% (w zależności od masy cząsteczkowej identyfikowanego białka) żelu poliakrylamidowym i prowadzono pionową elektroforezę denaturującą SDS-PAGE przy napięciu początkowym 80 V (przez początkowe 0,5 h), a następnie 120 V. Żel do elektroforezy przygotowywano z następujących odczynników: 30% (o/o) roztwór wodny akrylamidu/bisakrylamidu, 10% (w/o) roztwór wodny SDS, TEMED (N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) oraz nadsiarczan amonu (*ang. ammonium persulfate, APS*), Trizma base (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Następnie przeprowadzano elektrotransfer białek z żelu na membrany PVDF 0,2 μm (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) przez 70 min., przy napięciu 110 V w warunkach chłodzenia. Transfer prowadzono w buforze zawierającym Trizma base, glicynę (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) oraz metanol (POCH, Gliwice, Polska). W następnym etapie membrany blokowano przez 1 h, RT w buforze TBST (*ang. tris buffered saline with*

tween) [20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0,05% Tween20, pH 7,5] zawierającym 5% (w/o) odtuszczonego mleka w proszku. Kolejno membrany inkubowano przez noc w temperaturze 4°C w roztworze wybranych pierwszorzędowych przeciwciał w 5 % mleku.

W badaniach korzystano z następujących przeciwciał pierwszorzędowych:

- królicze anti-MAP-LC3 (1:1000) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA),
- mysie anti-aktyna, (1:2500) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)
- królicze anti-LDHA (1:1000) (Abcam, Cambridge, UK)
- królicze anti HIF-1 α (1:250) (Abcam, Cambridge, UK)
- królicze anti-PDK1 (1:1000) (Abcam, Cambridge, UK)

Następnego dnia membrany trzykrotnie płukano (5 min.) w roztworze TBST i inkubowano przez 1 h w RT w roztworze odpowiednich przeciwciał drugorzędowych (anty-króliczych (1:1000) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) lub anti mysich (1:1000) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) w 5% mleku. Membrany ponownie trzykrotnie płukano w roztworze TBST i wywoływano używając odczynnika ECL plus (WesternBright Sirius Chemiluminescent Detection Kit, Advansta Inc., San Jose, CA, USA). Detekcja prążków odbywała się z wykorzystaniem aparatu G-Box (Syngene, Cambridge, UK).

3.3.9. Ocena zmian ultrastruktury komórek z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej (TEM)

Komórki hodowano na szalkach Petriego o średnicy 30 mm. Po zakończeniu inkubacji komórki utrwalano w 2% paraformaldehydzie i w 2,5% aldehydzie glutatowym w 0,1 M roztworze buforu kakodylanowego (pH 7,4) przez 1 h w temperaturze 4°C. Tak przygotowany preparat przepłukiwano tym samym buforem i utrwalano w 1% OsO₄ w 0,1 M roztworze buforu kakodylanowego przez 1 h w RT. Następnie komórki odwadniano w rosnących stężeniach alkoholu etylowego, a na koniec w czystym tlenku propylenu (10 min.) po czym zatapiano w żywicy Epon 812. Wycinano ultracienkie fragmenty materiału, które zbierano na miedzianych siatkach, suszono na powietrzu i barwiono przez 10 min 4,7% octanem uranylu i cytrynianem ołowiu przez 2 min. Siatki suszono a następnie obserwowano ultrastrukturę komórek za pomocą mikroskopu elektronowego JEOL JEM 1400 (JEOL Co, Tokio, Japonia). Analizy TEM wykonano w Laboratorium Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie.

3.4. Produkcja rekombinowanego białka ludzkiej Heksokinazy II

Produkcja i oczyszczanie rekombinowanego białka ludzkiej HK II zostały przeprowadzone we współpracy z Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego (CNBCh UW).

Do zaprojektowania genu kodującego ludzką heksokinazę II (HK II) wykorzystano narzędzia internetowe firmy GenArt (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Gen HK21 (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) został zoptymalizowany kodonowo tak, aby jego ekspresja w komórkach bakterii *E. coli* była możliwie najwydajniejsza. Projektowanie starterów oraz klonowanie *in silico* zostało przeprowadzone z wykorzystaniem platformy benchling.com. Jako wektor wybrano wektor plazmidowy pMCSG7 z sekwencją 6xHis-TEV i opornością na ampicylinę (BioShop, Ontario, Kanada). Startery, czyli oligonukleotydy komplementarne odpowiednio do 5' i 3' powielanego fragmentu DNA, do amplifikacji wektora oraz insertu zawierającego gen HK21 zostały zamówione z firmy Genomed (Warszawa, Polska).

3.4.1. Klonowanie molekularne

W celu powielenia fragmentu DNA kodującego gen HK21 przeprowadzono reakcję łańcuchową polimerazy (ang. *polimerase chain reaction*, PCR) w celu namnożenia wektora oraz insertu. Technika Gibson Assembly klonowania molekularnego (metoda pozwalająca na łączenie ze sobą wielu fragmentów DNA w jednej izotermicznej reakcji z wykorzystaniem trzech enzymów: egzonukleazy, polimerazy DNA oraz ligazy DNA) wprowadzono do plazmidu pMCSG7 insert i wektor. Następnie transformowano uzyskany plazmid do bakterii kompetentnych *E. coli* (Uniwersytet Warszawski, Polska) w celu namnożenia DNA. W celu potwierdzenia prawidłowości przeprowadzonego eksperymentu przeprowadzono izolację DNA i jego analizę restrykcyjną na żelu agarozowym.

3.4.2. Reakcja PCR insertu i wektora

Do przeprowadzenia reakcji PCR użyto następujących odczynników:

- Jałowa woda dejonizowana do PCR (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)
- Q5 Reaction Buffer (NEB, Ipswich, MA, USA)
- Starter forward (dla insertu lub wektora)
- Starter revers (dla insertu lub wektora)
- dNTPs (Ultrapure DNTPs Mix, EURx, Gdańsk, Polska)
- matryca (DNA insertu lub wektora)

- DMSO (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Hot start Q5 polymerase (NEB, Ipswich, MA, USA)

Warunki i etapy reakcji PCR:

1. Wstępny etap denaturacji DNA - 98°C, 5 min.
2. Etap denaturacji - 98°C, 30 s.
3. Etap przyłączania nukleotydów - gradient temperaturowy 67-72°C, 15 s.
4. Elongacja – 20 s./kb, 72°C, 6 min.
5. Końcowy etap elongacji - 72°C, 8min.

Liczba cykli - 32

Reakcję PCR przeprowadzono w termocyklerze C1000 Touch (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Wielkość powstałych fragmentów i poprawność przeprowadzonej reakcji została potwierdzona za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym w obecności buforu TAE (0,04 M Tris-octan, 1 mM EDTA) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) i barwnika Sybro Safe (Invitrogen, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Do oczyszczania produktów PCR wykorzystano zestaw Nucleic Acid Purification Monarch (NEB, Ipswich, MA, USA).

Etapy oczyszczania DNA:

1. Rozcieńczenie próbki w buforze do wiązania DNA i nałożenie na minikolumnę
2. Oddzielenie DNA od pozostałych składników próbki poprzez wirowanie
3. Dwukrotne płukanie DNA znajdującego się na minikolumnie
4. Elucja DNA

Stężenie oczyszczonych produktów PCR mierzono za pomocą spektrofotometru DS-11 (DeNovix Inc., Wilmington, DE, USA).

3.4.3. Klonowanie molekularne z użyciem techniki Gibson Assembly

Insert oraz wektor w stosunku molowym 3:5 (stosunek ilości pz 1:1) oraz trzykrotnym nadmiarze zostały wprowadzone do mieszaniny reakcyjnej Gibson Assembly Mix (NEB, Ipswich, MA, USA) i inkubowane przez godzinę w temperaturze 50°C.

3.4.4. Transformacja bakterii kompetentnych metodą szoku termicznego

Do transformacji wykorzystano kompetentny szczep bakterii *E. coli*, DH5α (Uniwersytet Warszawski, Polska). Do próbówki typu Eppendorf zawierającej 50 µL hodowli bakteryjnej

wprowadzono 3 μ L DNA uzyskanego w poprzednim punkcie i inkubowano na lodzie przez 30 min. Następnie bakterie poddano szokowi termicznemu przez 60 s. w temperaturze 42°C, po czym przenoszono na 2 min. na lód w celu zwiększenia pobierania DNA do komórek bakterii. W kolejnym etapie do bakterii wprowadzono 200 μ L podłoża SOC (ang. *super optimal catabolite repression*) (NEB, Ipswich, MA, USA) i inkubowano w temperaturze 37°C przez 45 min. aby bakterie wykształciły antybiotykooporność. W ostatnim etapie bakterie wysiewano na płytki z agarem zawierającym 0,1% karbenicyliny (LabEmpire, Rzeszów, Polska) jako czynnika selekcyjnego i hodowano w inkubatorze (Binder, Tuttlingen, Niemcy) w temperaturze 37°C przez noc. Następnego dnia pobierano powstałe klony bakterii, zaszczepiano na płynne podłoże LB (ang. *lysogeny broth*) z 0,1% karbenicyliną (LabEmpire, Rzeszów, Polska) w 25 mL kolbkach i hodowano przez noc w 37°C z mieszaniem 120 rpm w celu namnożenia DNA.

Skład podłoża LB:

- trypton [10 g/L] (BioShop, Ontario, Kanada)
- ekstrakt drożdżowy [5 g/L] (BioShop, Ontario, Kanada)
- NaCl [5 g/L] (BioShop, Ontario, Kanada)
- LB Broth Lennox [20 g/L] (BioShop, Ontario, Kanada)

Izolację DNA przeprowadzano z wykorzystaniem GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). W celu potwierdzenia prawidłowości sekwencji wyizolowanego DNA, próbki DNA zostały poddane sekwencjonowaniu metodą Sangera (Genomed, Warszawa, Polska).

3.4.5. Transformacja do szczepu ekspresyjnego metodą szoku termicznego

Jako szczep ekspresyjny wybrano bakterie *E. coli* szczepu BL21-(DE3) (Uniwersytet Warszawski, Polska). Proces transformacji metodą szoku termicznego analogicznie jak w punkcie 3.2.4. Transformowane bakterie wysiewano na szalki Petriego z agarem zawierającym 0,1% karbenicyliny (LabEmpire, Rzeszów, Polska) i hodowano w temperaturze 37°C przez noc.

3.4.6. Testowanie warunków ekspresji białka

W celu wyboru warunków hodowli, w których ekspresja białka byłaby najwyższa, przeprowadzono optymalizację: stężenia IPTG (ang. *isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*) (BioShop, Ontario, Kanada), temperatury hodowli oraz gęstości bakterii, przy której indukowano ekspresję.

Transformowane bakterie pobierano z szalki i zaszczepiano do kolb 25 mL zawierających po 8 mL podłoża standardowego (pożywka LB zawierająca 0,1% karbenicyliny) i hodowano przez noc w 37°C, z mieszaniem 120 rpm. Następnego dnia pobierano 0,5 mL zawiesiny bakteryjnej i wprowadzano do nowych kolb zawierających podłoże standardowe lub niestandardowe (pożywka SB zawierająca 0,1% karbenicyliny bądź podłoże autoindukcyjne) w celu ustalenia optymalnego składu. Hodowlę kontynuowano w tych samych warunkach do uzyskania OD = 0,3 lub OD = 0,6, a następnie indukowano ekspresję białka stosując IPTG w stężeniach 0,1 lub 0,2 lub 0,4 lub 0,5 lub 1 μM. Tak przygotowane zawiesiny bakteryjne hodowano przez noc w temperaturze 15°C, 18°C lub RT z mieszaniem 120 rpm. Następnego dnia hodowlę wirowano (4°C, 4500 rpm, 20 min.) i testowano różne buforu lizujące (punkt 3.2.7). Dodatkowo, przed użyciem, do buforów dodawano PMSF [0,2 M] (BioShop, Ontario, Kanada) oraz lizozym (BioShop, Ontario, Kanada). Wszystkie etapy były wykonywane na lodzie. Osad bakteryjny rozbijano w buforze do lizy i poddawano procesowi sonikacji (VCX 130 PB, Sonics, Newtown, CT, USA) w warunkach (puls - 2 s., czas- 10 min., amplituda - 40%). Następnie lizat komórkowy wirowano (4°C, 12000 rpm, 40 min.). Równe objętości lizatów наносono do studzienek w 10 % (o/o) denaturującym żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) i poddawano elektroforezie przy napięciu 200 V (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Skład buforu podstawowego do lizy komórkowej:

- Tris-HCl pH 8 [15 mM] (BioShop, Ontario, Kanada)
- glukoza [50 mM] (BioShop, Ontario, Kanada)
- Triton X-100 [0,5% (v/v)] (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)
- glicerol [9% (v/v)] (BioShop, Ontario, Kanada)

3.4.7. Mutageneza plazmidu

Do przeprowadzenia ukierunkowanej mutagenezy użyto zestawu Q5 Site Directed Mutagenesis (NEB, Ipswich, MA, USA). Mieszaninę reakcyjną składającą się z 1 μL DNA (produkt PCR), 5 μL KLD Reaction Buffer, 1 μL KLD Enzyme Mix oraz 3 μL H₂O inkubowano przez 5 min. w RT a następnie przeprowadzono transformację do szczepu ekspresyjnego *E. coli* DH5α (punkt 3.2.4.). Poprawność przeprowadzonej mutagenezy potwierdzono za pomocą sekwencjonowania metodą Sangera (Genomed, Warszawa, Polska). Następnie powtórzono punkt 3.2.5. (Transformacja plazmidu po mutagenezie do szczepu ekspresyjnego) i testowano różne warunki ekspresji, analogicznie do punktu 3.2.6. (Testowanie warunków ekspresji białka).

3.4.8. Produkcja białka HK II w systemie bakteryjnym *E. coli* BL21 w dużej skali

Dzięki przeprowadzonej mutagenie plazmidu uzyskano wysoką ekspresję białka w rozpuszczalnej frakcji lizatu bakteryjnego. W celu produkcji białka HK II w dużej skali, ponownie przeprowadzono transformację produktu PCR po mutagenie do szczepu ekspresyjnego BL21(DE3) (analogicznie jak punkcie 3.2.6.). Kolonie uzyskane po 24 h hodowli nocnej zaszczipiono do dwóch 1 L kolb zawierających pożywkę LB z dodatkiem 0,1% karbenicyliny. Komórki hodowano w 37°C z mieszaniem do uzyskania OD = 0,6. Indukcję ekspresji białka inicjował dodatek 0,1 μM IPTG. Następnie hodowla była kontynuowana przez noc w 16°C z mieszaniem 120 rpm. Po 24 h komórki zwirowano (4°C, 4500 rpm, 20 min.). Do przeprowadzenia lizy komórek użyto buforu lizującego (punkt 3.2.6) z dodatkiem 0,2 M PMSF, 2 mM β-merkaptioetanolu (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) oraz niewielką ilością lizozymu. Przeciętnie, pelet komórek bakterii uzyskany z 1 L hodowli był lizowany w 40 mL buforu lizującego. Następnie przeprowadzano sonikację (puls – 2 s., czas - 10min., amplituda - 40%) i wirowanie (4°C, 15000 g, 30 min.). Supernatant filtrowano na filtrze strzykawkowym o średnicy porów 0,22 μm (Chemland, Stargard, Polska).

3.4.9. Oczyszczanie białka

Oczyszczanie białka prowadzono dwuetapowo. We wstępnym oczyszczaniu stosowano technikę chromatografii powinowactwa IMAC (ang. *immobilized metal chelate affinity*). Faza stacjonarna w kolumnie związana jest z jonami niklu. Złóże to pozwala na wiązanie białek zawierających w swojej sekwencji sześć histydyn na zasadzie wzajemnego powinowactwa pierścieni imidazolowych w resztach histydynowych do kationów niklu. Po wstępnym oczyszczeniu przeprowadzano rozdział białek za pomocą chromatografii wykluczania SEC (ang. *size exclusion chromatography*), w której białka rozdzielane są ze względu na ich masę. Kolejność wymywanych białek związana jest z zatrzymywaniem cząsteczek w porach złoża, a czas ich przebywania wewnątrz porów jest proporcjonalny do ich wielkości. Im mniejsza masa molekuly tym skuteczniejsze zatrzymanie białka w porach i tym dłuższy czas jego wypłukania z kolumny.

Skład buforu fosforanowego do elucji SEC:

- bufor fosforanowy pH 8 [25 mM] ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$)
- NaCl [500 mM] (BioShop, Ontario, Kanada)

Chromatografia powinowactwa IMAC

W pierwszej kolejności złoże Ni Sepharose 6 Fast Flow (R18) (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) przepłukiwano dwukrotnie wodą, następnie pobierano 1 mL złoża i wprowadzano do supernatantu. Mieszaninę inkubowano przez 1 h na kołyszce laboratoryjnej w temperaturze 10°C. Roztwór białka związany ze złożem niklowym przepuszczano przez kolumnę (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) i przepłukiwano buforem do lizy. Elucję przeprowadzano buforem do lizy z dodatkiem 300 mM imidazolu (BioShop, Ontario, Kanada). Obecność białka potwierdzano za pomocą elektroforezy SDS-PAGE w 10% żelu poliakrylamidowym przy napięciu 200 V.

Chromatografia wykluczania SEC

Przygotowanie próbek do kolejnego etapu oczyszczania obejmowało zatężanie roztworu białka oraz wymianę buforu na fosforanowy bufor do elucji FPLC (ang. *fast performance liquid chromatography*). Do zatężania roztworu białka wykorzystywano kolumny 50 mL, 15 mL oraz 1,5 mL (Pall Corporation, Nowy Jork, NY, USA). Pod koniec zatężania (0,2 mL białka) kolumnę uzupełniano do pełna buforem do elucji i ponownie zatężano do 0,2 mL. Czynność powtarzano dwukrotnie w celu całkowitej wymiany buforu. Chromatografię rozmiarów wykluczania SEC prowadzono z użyciem złoża GE Superdex 200 16/60 na aparacie FPLC AKTA (GE Healthcare, Chicago, IL, USA).

3.5. Badania biochemiczne i fizykochemiczne

Badania biochemiczne i fizykochemiczne zostały przeprowadzone we współpracy z Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego (CNBCh UW).

3.5.1. Analiza hamowania aktywności HK II przez halogenopochodne w układzie pozakomórkowym

W celu oznaczenia hamowania aktywności HK II wykorzystano Hexokinase II inhibitor Screening Kit (Abcam, Cambridge, UK). W eksperymencie tym wykorzystywana jest zdolność HK II do fosforylacji glukozy do G-6-P, który następnie jest utleniany do NADH. Produkt ten redukuje bezbarwny wskaźnik do kolorowego produktu o silnej absorbancji przy długości fali 450 nm. W celu oznaczenia hamowania aktywności HK II przez badane związki przygotowano ich następujące stężenia: 50 mM, 40 mM, 25 mM, 5 mM, 0,5 mM, 0,05 mM, 0,005 mM. Przygotowano również kontrolę pozytywną inhibitora HK II (50 μ M kwasu bromopirogronowego) oraz kontrolę działania enzymu HK II. Do dołków płytki 96-dołkowej

wprowadzano po 50 μL przygotowanych stężeń oraz kontrole. Do każdego dołka dodawano 5 μL roztworu enzymu HKII i inkubowano przez 5 min w RT. Następnie do dołków wprowadzano 45 μL mieszaniny substratów reakcji (29 μL buforu, 10 μL substratu HK II, 2 μL koenzymu, 2 μL konwertera oraz 2 μL dewelopera). W celu oznaczenia hamowania aktywności HK II prowadzono pomiar kinetyczny przez 40 min. w RT przy długości fali 450 nm. W celu potwierdzenia specyficzności hamowania HK II przygotowano również doświadczenie, w którym do reakcji z badanymi próbkami wprowadzono dodatkowo wzrastające stężenia glukozy (5 mM, 10 mM, 20 mM oraz 40 mM). Założono, że jeśli inhibicja jest specyficzna to zahamowanie aktywności HK II powinno zostać zniwelowane przy wysokim stężeniu glukozy.

Dodatkowo, przeprowadzono analogiczne doświadczenie oznaczając hamowanie aktywności bakteryjnej heksokinazy pochodzącej z *Bacillus Subtilis* (wykorzystując Hexokinase Inhibitor Assay Kit, Abcam, Cambridge, UK) przez 2-DG i jej fluoropochodne. Celem tego eksperymentu była ocena selektywności halopochodnych wobec ludzkiej HK II.

3.5.2. Krystalizacja pochodnych glukozy

W celu uzyskania kryształów badanych związków odpowiednich do analizy krystalograficznej, przeprowadzono krystalizację metodą stopniowego chłodzenia. Odważano 3 - 4 mg każdego związku i rozpuszczano w 0,5 mL etanolu, izopropanolu, lub ich mieszaninie (1:1) w 90°C. Następnie pozostawiano roztwory w RT lub w chłodziarce (10°C), aż do całkowitego odparowania rozpuszczalnika.

3.5.3. Krystalizacja HK II

Przygotowanie próbek - ocena jakości preparatu, zatężanie i zmiana buforu

Fracje oczyszczonego białka (punkt 3.4.9) zbierano i zatężano na koncentratorze do białek (Pall Life Science, Nowy Jork, NY, USA) według zaleceń producenta. W celu pozbycia się z roztworu fosforanów, które mogłyby zakłócać proces krystalizacji, wymieniano bufor fosforanowy na bufor krystalizacyjny. Zatężone białko o stężeniu 10 mg/mL rozcieńczano 20-krotnie w buforze do krystalizacji, po czym ponownie zatężano do końcowego stężenia około 5 mg/mL.

Skład buforu do krystalizacji białka:

- NaCl [150 mM] (BioShop, Ontario, Kanada)

- TCEP (*tris(2-carboxyethyl)phospine hydrochloride*) [0,5 mM] (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA)
- glicerol [5%] (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA)
- HEPES (*N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)*) [10 mM, pH 7,8] (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA)

Krystalizacja białka

Podjęto próby krystalizacji uzyskanego białka HK II. Krystalizacja białek jest procesem niezwykle trudnym a uzyskanie satysfakcjonujących kryształów jest bardzo czasochłonne. Dotychczas nie udało się uzyskać kryształów spełniających wymagania do przeprowadzenia analiz krystalograficznych. Trwają również prace nad dokowaniem oddziałujących halopochodnych do centrum aktywnego HK II z wykorzystaniem modelowania molekularnego. Krystalografia była prowadzona na płytkach 24-dółkowych metodą wiszącej kropli (*z ang. hanging drop*), wielkość kropli = 4 μ l, stosunek roztworu białka do roztworu krystalizacyjnego wynosił 1:1. Skład roztworu białka podano powyżej, natomiast skład buforu krystalizacyjnego był następujący:

- glikol polietylenowy (PEG) 3350 [16%] (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA)
- malonian sodu [0,2 M] (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA)
- Bis-Tris propan (BTP) pH 8 [0,1 M] (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA)
- Bis-Tris propan (BTP) pH 9 [0,1 M] (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA)
- glikol etylenowy [10%] (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA)
- DTT (ditiotretiol) [1 mM] (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA)

Wszystkie składniki buforów po uzyskaniu odpowiednich stężeń były filtrowane na filtrze strzykawkowym o średnicy porów 0,22 μ m (Chemland, Stargard, Polska).

Krystalizacja była prowadzona w temperaturze 16°C przez okres kilku miesięcy, ale dotychczas nie zaobserwowano powstawania kryształów – tylko agregaty białka lub klarowny roztwór.

3.6. Analiza statystyczna

Wszystkie wyniki były analizowane statystycznie za pomocą programu GraphPad Prism™ w wersji 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Do analizy wykorzystywano jednokierunkowy test analizy wariancji ANOVA z wielokrotnymi porównaniami Tukeya i/lub dwukierunkowy test analizy wariancji ANOVA a następnie test

wielokrotnych porównań (test Bonferroniego). Słupki błędów wskazują błąd standardowy średniej (SEM). Istotne statystycznie różnice oznaczone zostały na poziomach istotności * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Wartości przedstawiają średnie wyniki z co najmniej trzech niezależnych eksperymentów.

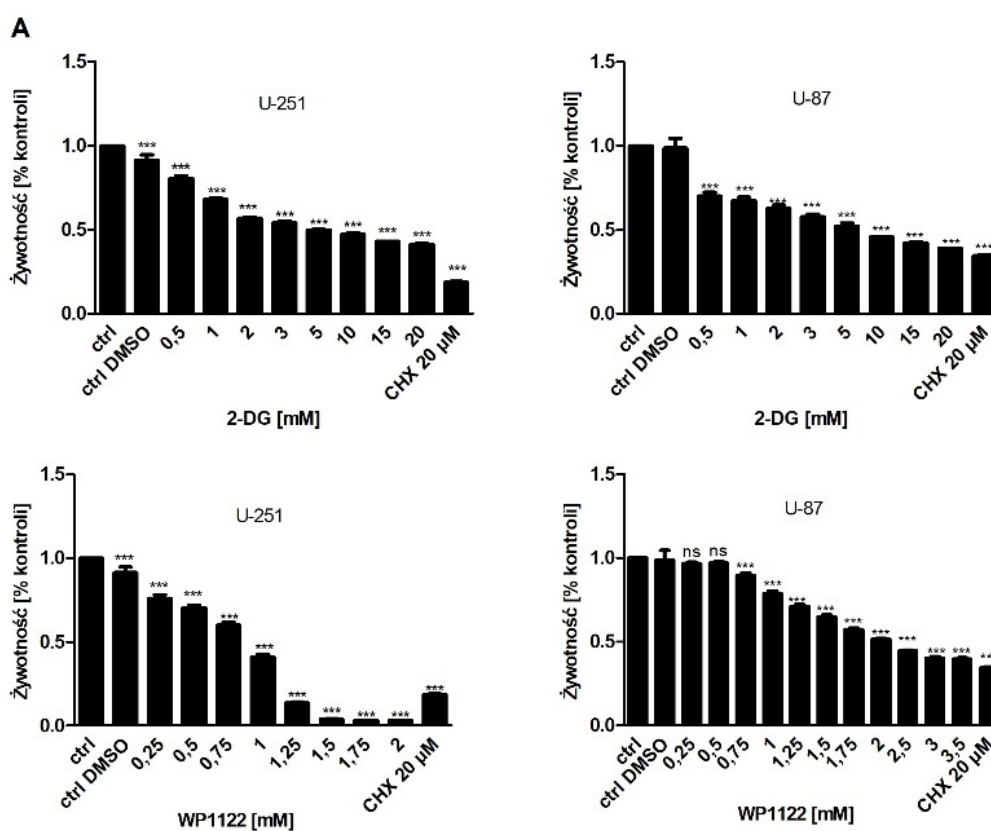
W przypadku wyników badań fizykochemicznych korzystano z programu SigmaPlot w wersji 11.0 firmy Systat Software Inc. (San Jose, CA, USA).

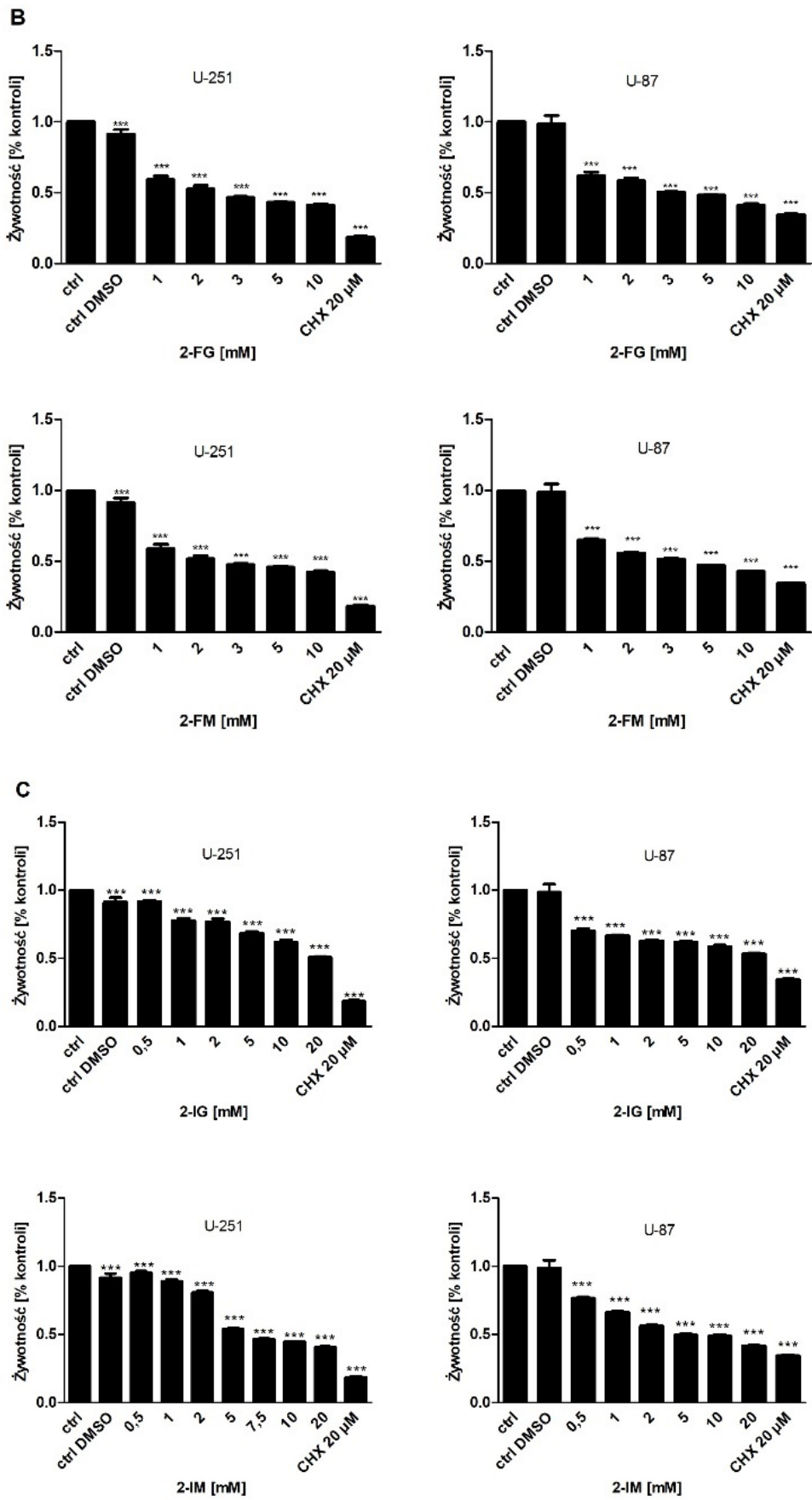
4. Wyniki

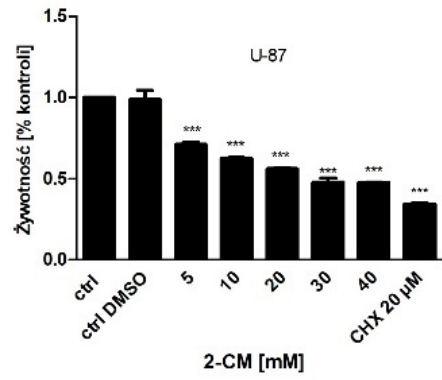
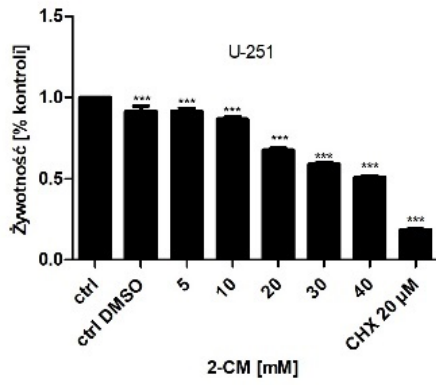
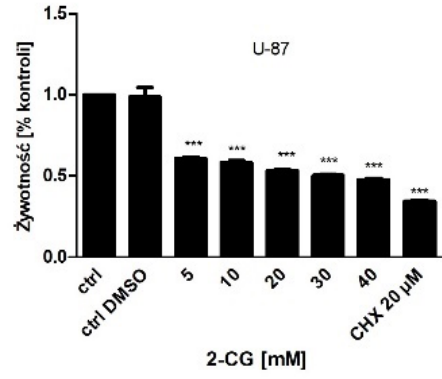
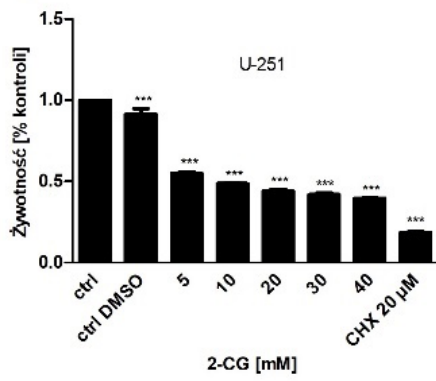
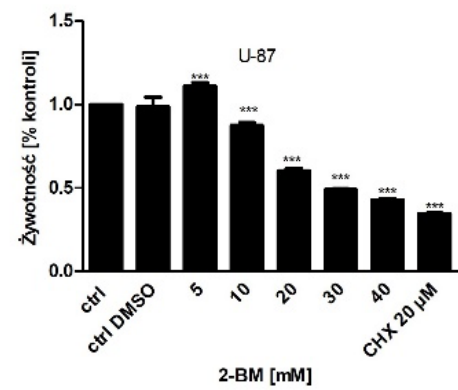
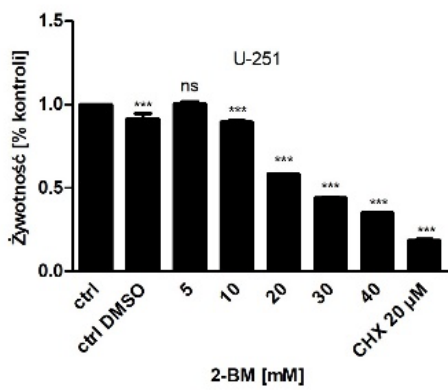
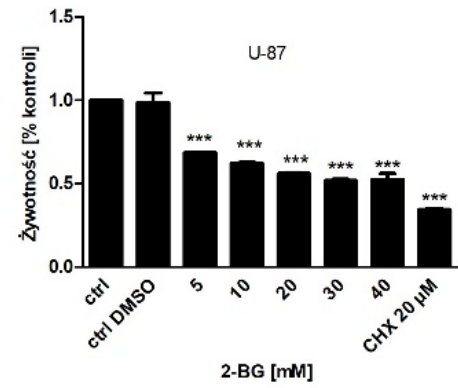
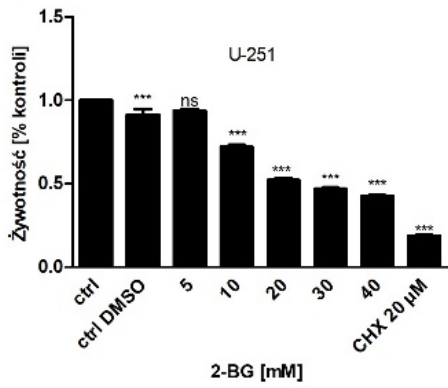
4.1. Badania na modelu in vitro

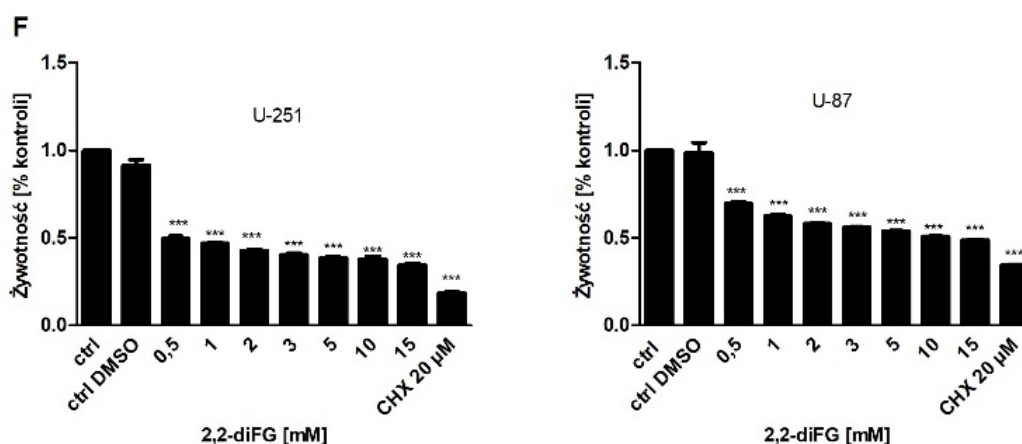
4.1.1. Wpływ halo-pochodnych 2-DG na żywotność komórek GBM w warunkach normoksji i symulowanej hipoksji

Żywotność (przeżywalność) komórek GBM linii U-87 oraz U-251 po 72 h inkubacji z badanymi związkami (Tabela 1) została oceniona za pomocą testu MTS, który pozwala ocenić aktywność dehydrogenaz mitochondrialnych. Dla każdej z badanych pochodnych wykonano analizę dawka-odpowieź w zakresach stężeń: 2-DG [0,5-20 mM], WP1122 [0,25-3,5 mM], 2-FG [1-10 mM], 2-FM [1-10 mM], 2-IG [0,5-20 mM], 2-IM [0,5-20 mM], 2-CG [5-40 mM], 2-CM [5-40 mM], 2-BG [5-40 mM], 2-BM [5-40 mM] oraz 2,2-diFG [0,5-15 mM]. Żywotność komórek traktowanych badanymi pochodnymi została porównana z żywotnością komórek kontrolnych (ctrl) – nietraktowanych. Jako kontrolę pozytywną zastosowano cykloheksimid (CHX) [20 μ M]. Ze względu na zastosowanie DMSO jako rozpuszczalnika CHX, w teście uwzględniono także kontrolne traktowanie DMSO [0,1 μ M]. Jak wskazuje Rycina 12, wszystkie badane pochodne zależnie od dawki istotnie statystycznie obniżyły żywotność komórek GBM.





D**E**



Rycina 12. Żywotność komórek linii U-251 i U-87 oznaczona za pomocą testu MTS po 72 h inkubacji z różnymi stężeniami pochodnych 2-DG: A) 2-DG [0,5 – 20 mM], WP1122 [0,25-3,5 mM], B) 2-FG [1-10 mM], 2-FM [1-10 mM], C) 2-IG [0,5-20 mM], 2-IM [0,5-20 mM], D) 2-CG [5-40 mM], 2-CM [5-40 mM], E) 2-BG [5-40 mM], 2-BM [5-40 mM], F) 2,2-diFG [0,5-15 mM]. Jako kontrolę pozytywną zastosowano CHX [20 µM]. Istotność różnic pomiędzy poszczególnymi stężeniami a kontrolą oznaczono * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ i *** $P < 0,001$.

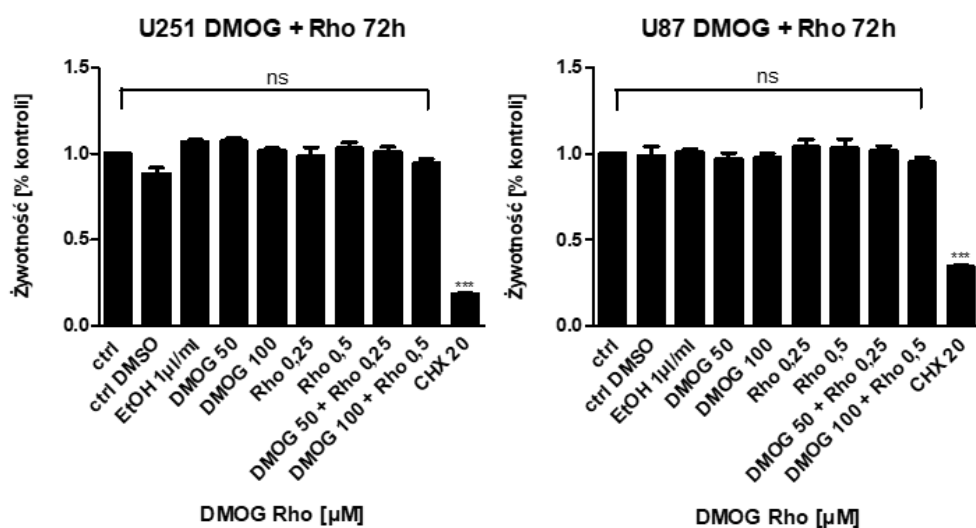
Na podstawie analizy żywotności komórek wyznaczono dla każdej z badanych pochodnych wartość IC_{50} , odpowiadającą stężeniu związku, przy którym proliferacja komórek zostaje zahamowana w 50 % w stosunku do komórek kontrolnych (nietraktowanych). Wyznaczone wartości IC_{50} stanowią średnią z 3 niezależnych pomiarów i zostały przedstawione w Tabeli 2.

Tabela 2. Wartości IC_{50} badanych związków dla linii komórkowych U-251 oraz U-87

Badany związek	IC_{50} [mM]	
	U-251	U-87
2-DG	5	5
WP1122	0,8	2
2-FG	2,5	3
2-FM	2,5	3,7
2,2-diFG	0,5	5
2-IG	20	> 20
2-IM	5,5	5
2-CG	8	10
2-CM	> 20	> 20
2-BG	20	> 20
2-BM	> 20	> 20

Najwyższą aktywność cytotoksyczną wobec komórek GBM linii U-251 wykazywała 2,2-diFG (IC_{50} - 0,5 mM), następnie WP1122 (IC_{50} - 0,8 mM), 2-FG, 2-FM (IC_{50} - 2,5 mM) oraz 2-IM (IC_{50} - 5,5 mM). Z kolei aktywność cytotoksyczną niższą od 2-DG zaobserwowano w przypadku 2-CG (IC_{50} - 8 mM). Najłabszą aktywność cytotoskyczną wykazywały 2-BG, 2-BM, 2-IG oraz 2-CM (IC_{50} >20 mM). Aktywność cytotoksyczna wszystkich związków z wyjątkiem 2,2-diFG była bardzo zbliżona wobec obu badanych linii komórkowych.

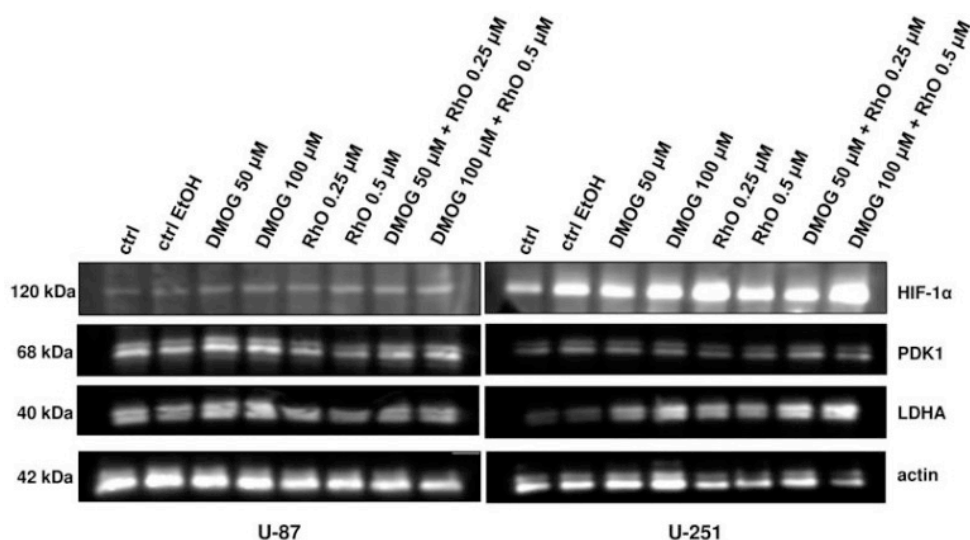
W celu oceny wpływu hipoksji na wrażliwość badanych komórek glejaka na hamowanie procesu glikolizy przez pochodne 2-DG zastosowano DMOG oraz Rodaminę 123 (Rho123). Efektem działania tych związków jest symulacja w komórkach zmian metabolicznych charakterystycznych dla warunków niedoboru tlenu. Pod wpływem działania DMOG, w komórkach ulega zahamowaniu aktywność hydroksylaz prolylowych prowadząc do wzrostu aktywności białka HIF-1 α . Z kolei Rho123 hamuje aktywność łańcucha oddechowego, upośledzając funkcję mitochondriów. Stężenia DMOG oraz Rho123 zostały wyznaczone w teście MTS dawka-odpowieź (Rycina 13) tak, aby indukować pożądane efekty wewnątrzkomórkowe bez efektu cytotoksycznego.



Rycina 13. Żywotność komórek linii U-251 oraz U-87 traktowanych DMOG [50 lub 100 μ M] i/lub rodaminą123 (Rho123) [0,25 lub 0,5 μ M]. Jako kontrolę pozytywną zastosowano CHX [20 μ M]. Istotność różnic pomiędzy poszczególnymi stężeniami a kontrolą oznaczono * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ i *** $P < 0,001$.

Efekty wewnątrzkomórkowe warunków symulujących hipoksję pod wpływem działania DMOG [50, 100 μ M] i Rho123 [0,25 i 0,5 μ M] (72 h inkubacji) potwierdzono analizą

ekspresji czynnika transkrypcyjnego HIF-1 α oraz regulowanej przez niego ekspresji enzymów glikolitycznych jak PDK1 i LDHA (Rycina 14).

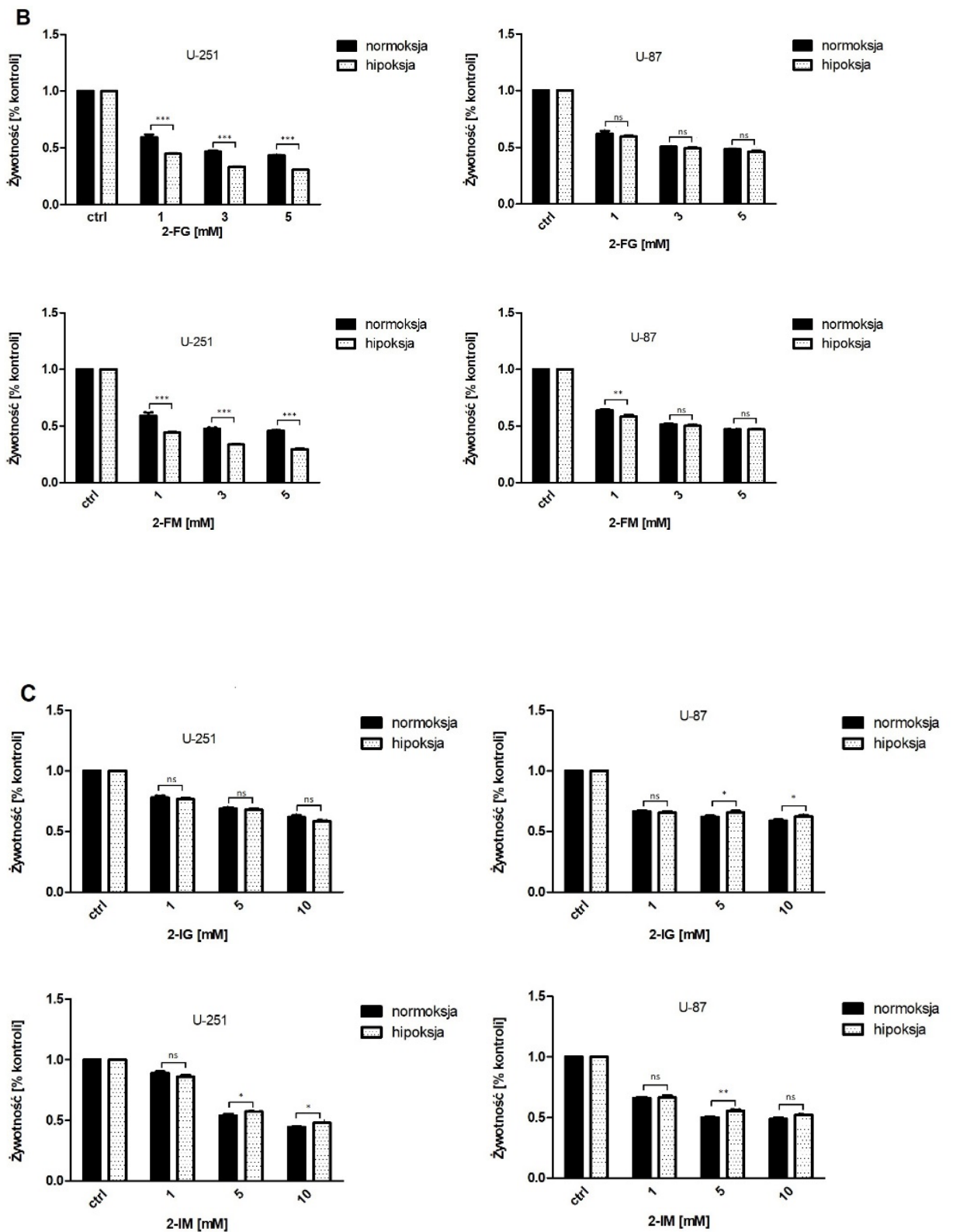


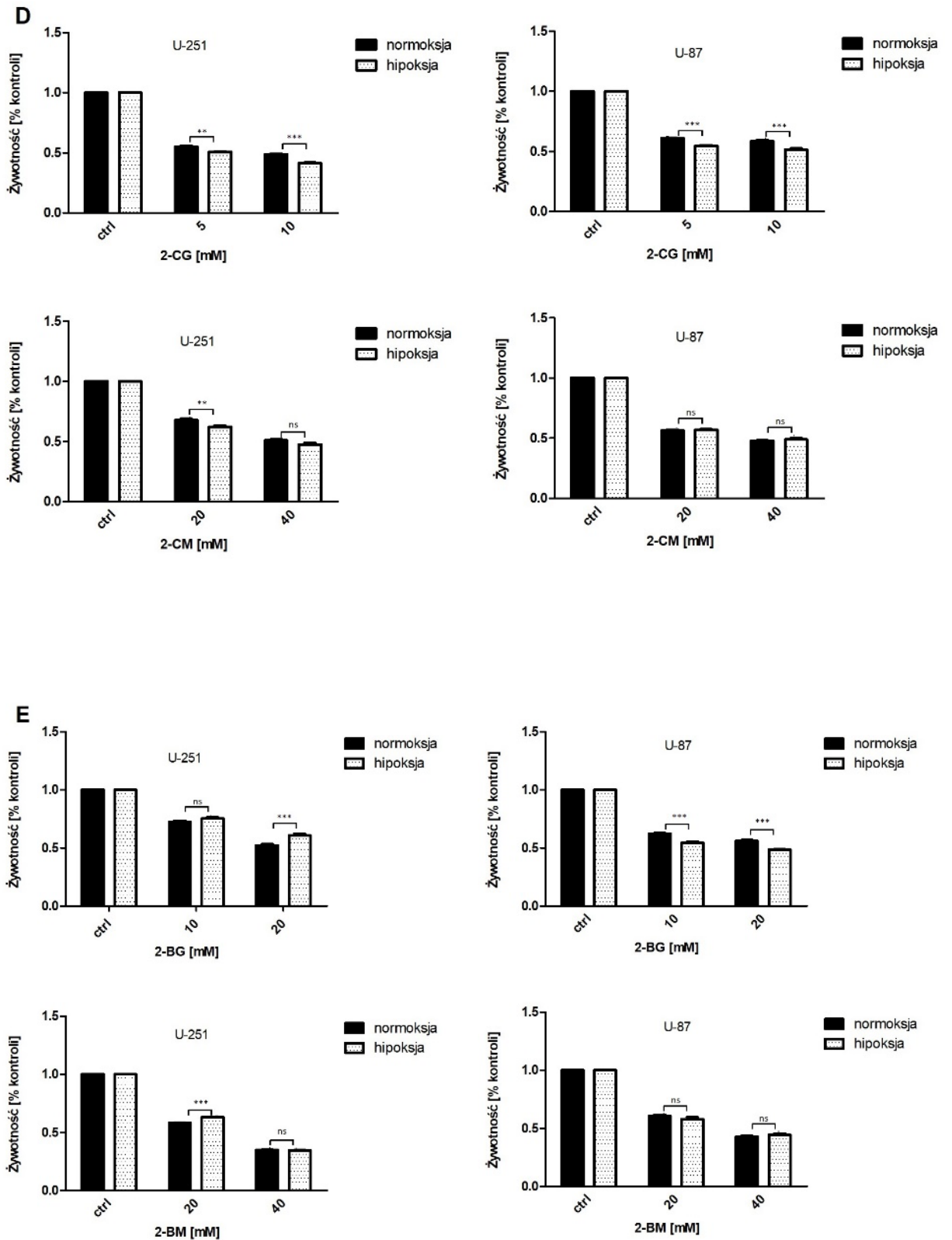
Rycina 14. Analiza Western blot poziomu ekspresji białek HIF-1 α , PDK1 oraz LDHA pod wpływem inkubacji z DMOG [50 lub 100 μ M] i/lub Rho-123 [0,25 lub 0,5 μ M] (72 h). Jako białko referencyjne oznaczono poziom aktyny.

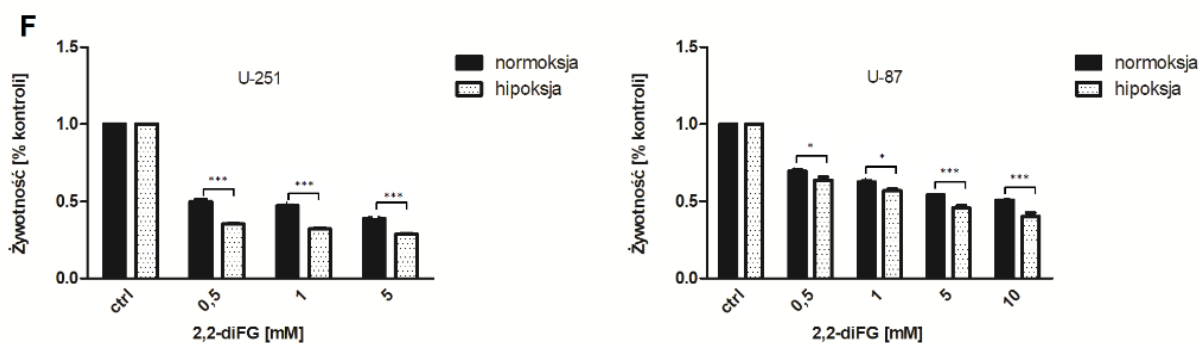
Analiza Western blot wykazała, że w wyniku inkubacji komórek z DMOG [50 lub 100 μ M] oraz Rho123 [0,25 lub 0,5 μ M] nastąpił wzrost ekspresji analizowanych białek. Ekspresja HIF-1 α wrosła pod wpływem inkubacji z DMOG i Rho123 w obu liniach komórkowych. Z kolei zmiany ekspresji białka PDK1 były większe w linii U-87, a białka LDHA w komórkach linii U-251.

Na podstawie przeprowadzonej analizy wyznaczono stężenia 50 μ M DMOG i 0,25 μ M Rho123 jako optymalne do stosowania w kolejnych doświadczeniach z badanymi pochodnymi 2-DG. Wykazano, że powyższa kombinacja DMOG i Rho123 indukuje ekspresję białek szlaku glikolizy, symulując warunki hipoksji, nie wpływając zarazem negatywnie na żywotność komórek.

W kolejnym etapie przeprowadzono analizę porównawczą żywotności komórek testem MTS, traktowanych badanymi pochodnymi w warunkach normoksji oraz warunkach symulujących hipoksję, po 72 h inkubacji (Rycina 15).





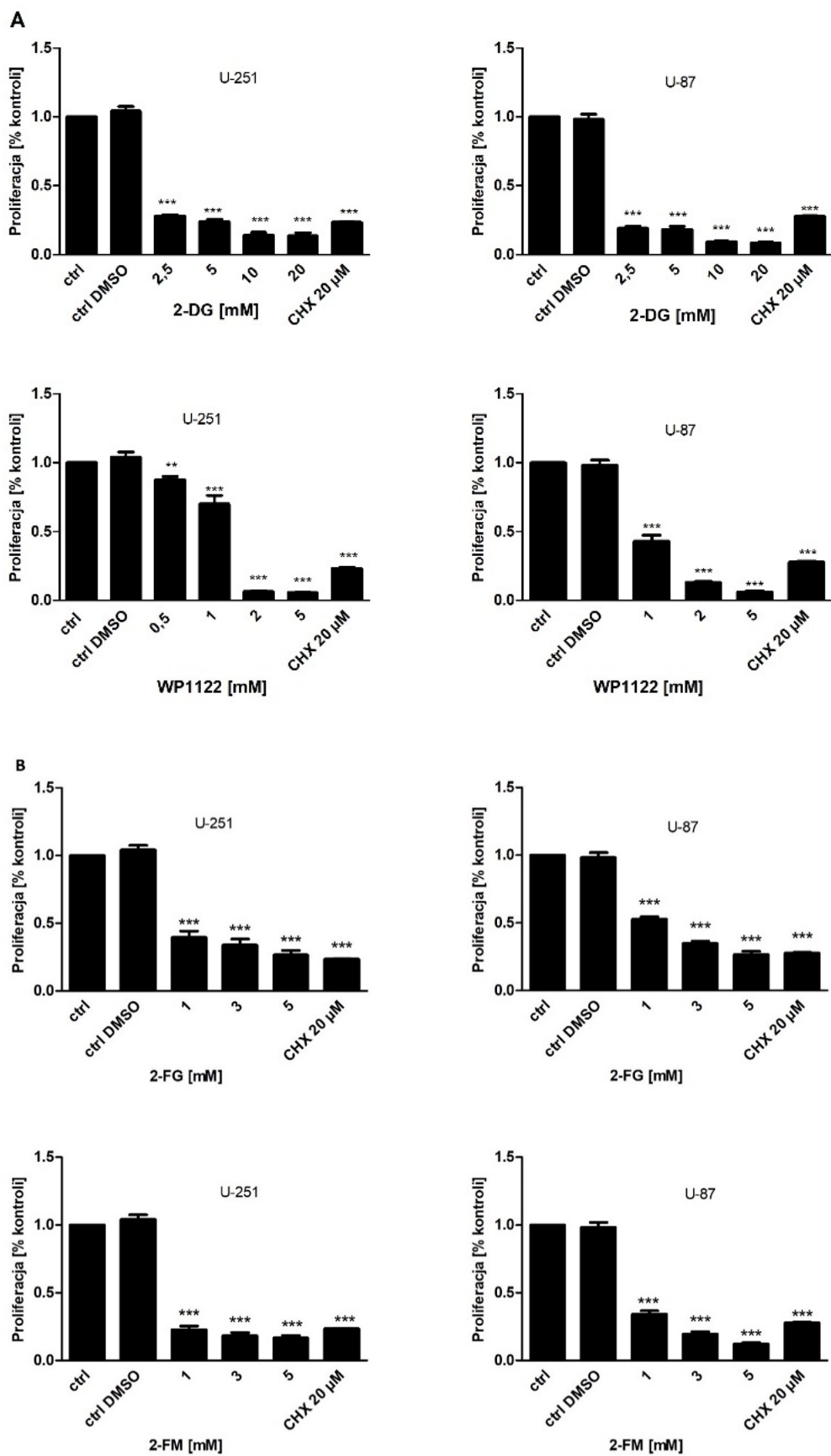


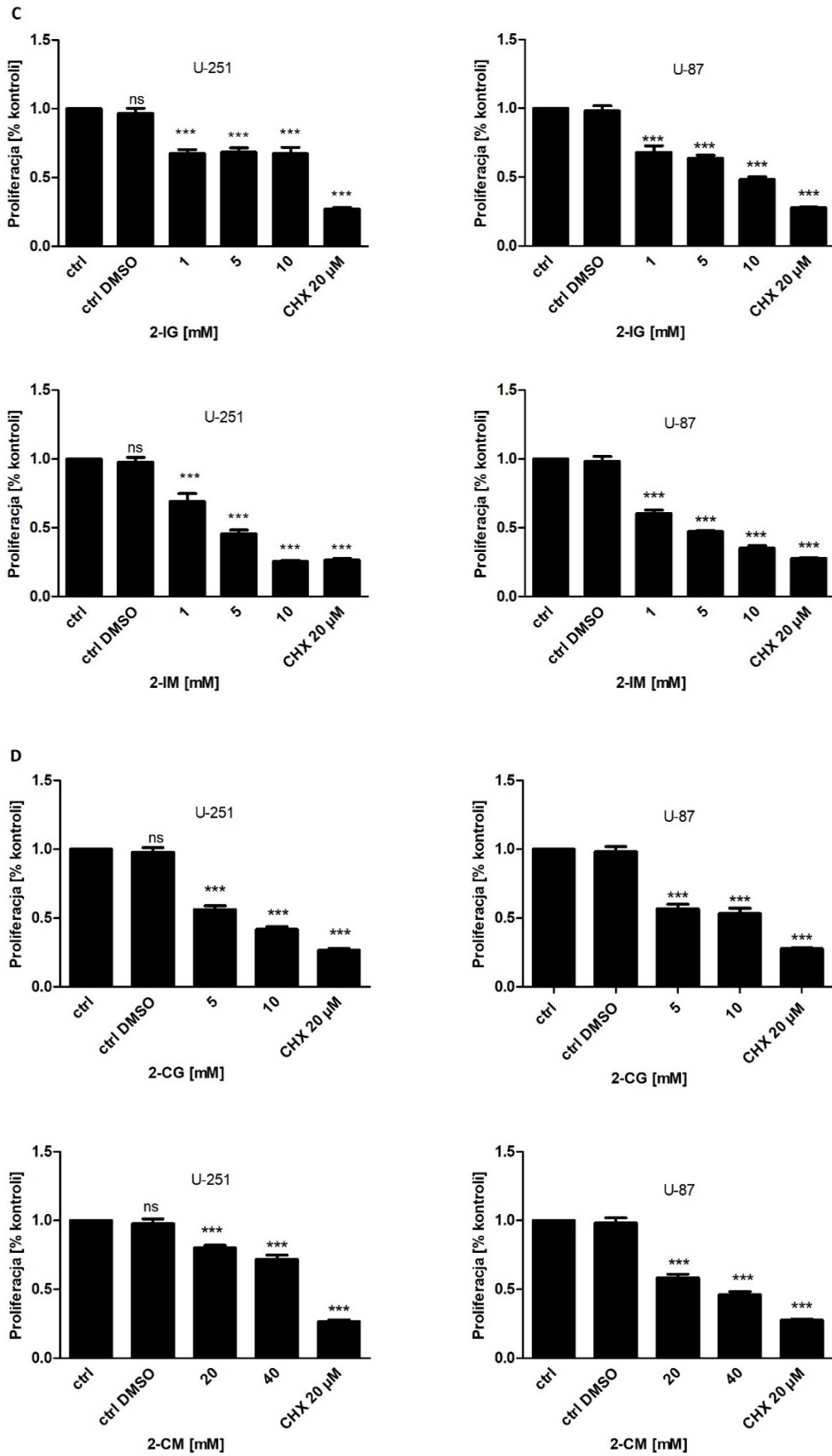
Rycina 15. Żywotność komórek linii U-251 i U-87 w warunkach normoksji oraz warunkach symulujących hipoksję po 72 h inkubacji z odpowiednimi stężeniami A) 2-DG [2,5-10 mM] i WP1122 [0,5-2 mM], B) 2-FG [1-5 mM] i 2-FM [1-5 mM], C) 2-IG [1-10 mM] i 2-IM [1-10 mM], D) 2-CG [1-10 mM] i 2-CM [1-10 mM], E) 2-BG [10, 20 mM] i 2-BM [20, 40 mM], F) 2,2-diFG [0,5-10 mM]. Istotność różnic pomiędzy poszczególnymi stężeniami a kontrolą oznaczono * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ i *** $P < 0,001$.

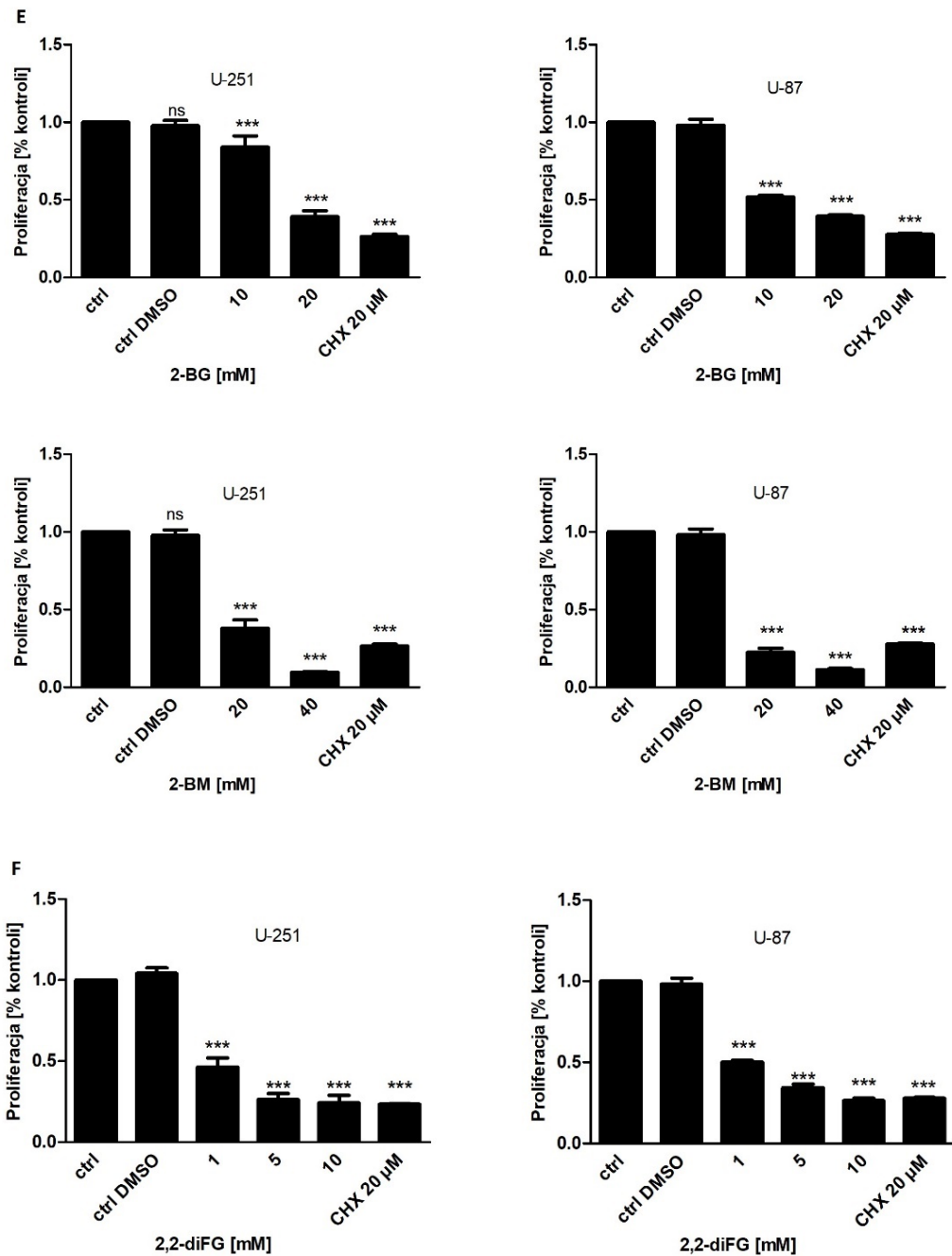
Jak wskazują uzyskane wyniki, żywotność komórek traktowanych badanymi pochodnymi w warunkach normoksji i hipoksji jest zbliżona, zwłaszcza w przypadku linii komórkowej U-87. Działanie 2-IG w większości stężeń nie było istotnie różne w komórkach obu badanych linii. W przypadku fluoropochodnych efekty cytotoksyczne w warunkach naśladujących hipoksję były istotnie wyższe w linii U-251. Działanie 2-CG i 2-BG było skuteczniejsze w warunkach hipoksji na obu liniach w przeciwieństwie do 2-CM i 2-BM, w których różnice nie były istotne statystycznie. Z kolei po zastosowaniu WP1122 w warunkach symulujących hipoksję, żywotność komórek linii U-251 była wyższa niż w warunkach normoksji (Rycina 15). Podsumowując, silniejszą aktywność cytotoksyczną pochodnych 2-DG w warunkach hipoksji obserwowano wobec komórek linii U-251.

4.1.2. Wpływ halogenopochodnych 2-DG na proliferację komórek GBM

Cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych GBM oceniano również poprzez analizę zmian proliferacji komórek po 72 h inkubacji z różnymi stężeniami badanych związków: 2-DG [2,5-20 mM], WP1122 [0,5-5 mM], 2-FG [1-5 mM], 2-FM [1-5 mM], 2-IG [1-10 mM], 2-IM [1-10 mM], 2-CG [5-10 mM], 2-CM [20-40 mM], 2-BG [10-20 mM], 2-BM [20-40 mM] oraz 2,2-diFG [0,5-5 mM]. Do oceny proliferacji wykorzystano test z bromodeoksyurydyną (BrdU), która wbudowuje się w nowopowstałą nić DNA dzielących się komórek. Analogicznie do wpływu badanych pochodnych 2-DG na żywotność komórek GBM, wzrastające stężenia związków istotnie statystycznie zmniejszały proliferację komórek obu linii w stosunku do komórek kontrolnych (Rycina 16).







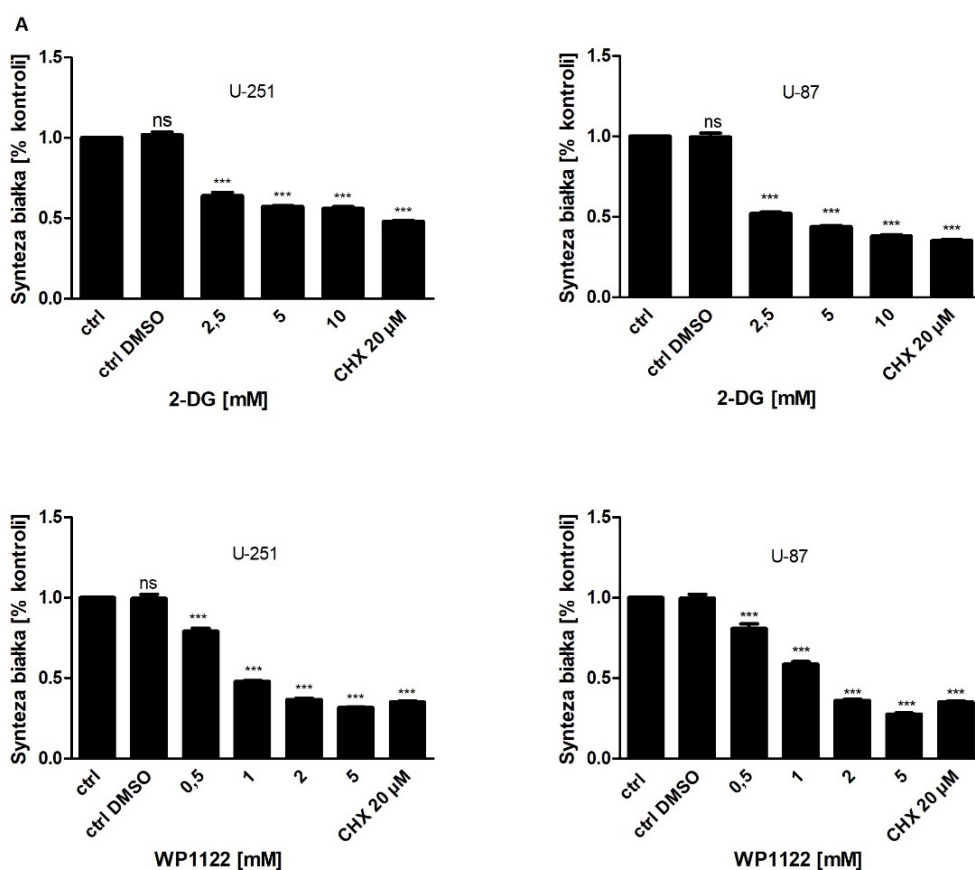
Rycina 16. Natężenie proliferacji komórek linii U-251 i U-87 ocenione z wykorzystaniem testu BrdU po 72 h inkubacji ze wzrastającymi stężeniami A) 2-DG [2,5-20 mM] i WP1122 [0,5-5 mM], B) 2-FG [1-5 mM] i 2-FM [1-5 mM], C) 2-IG [1-10 mM] i 2-IM [1-10 mM], D) 2-CG [5-10 mM] i 2-CM [20-40 mM], E) 2-BG [10-20 mM] i 2-BM [20-40 mM], F) 2,2-diFG [0,5-5 mM]. Jako kontrolę pozytywną zastosowano CHX [20 μM]. Wyniki wyrażono jako odsetek wartości kontrolnej. Istotność różnic pomiędzy poszczególnymi stężeniami a kontrolą oznaczono * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ i *** $P < 0,001$.

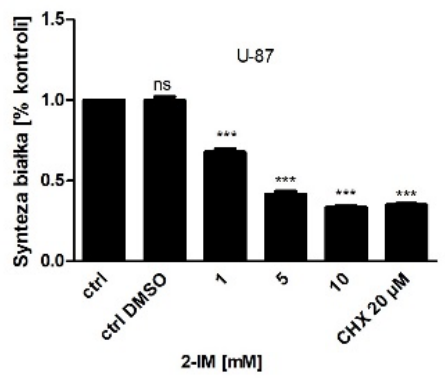
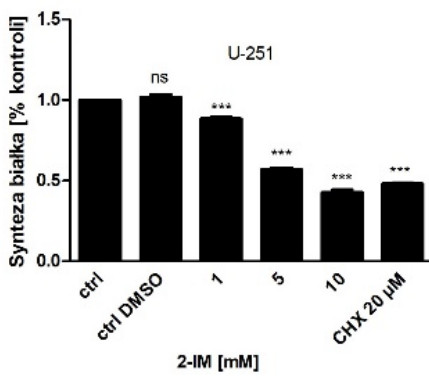
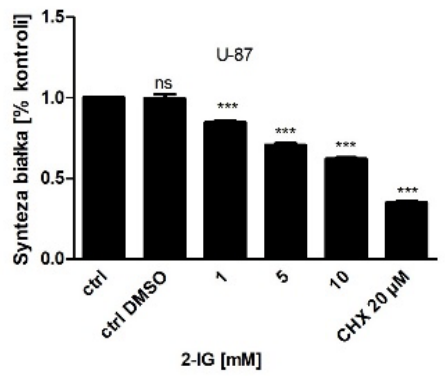
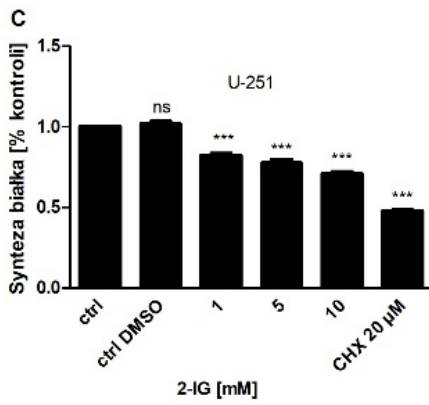
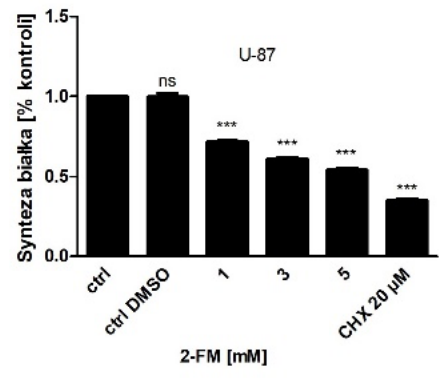
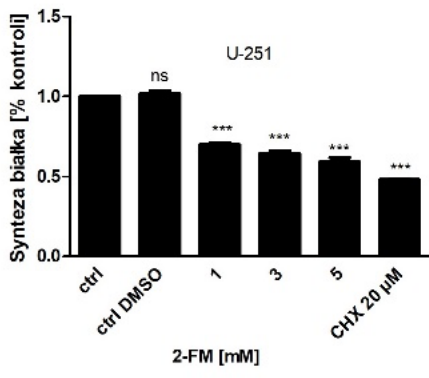
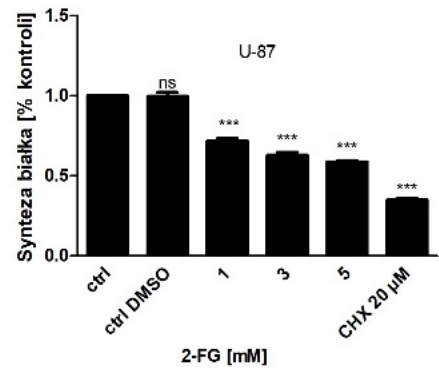
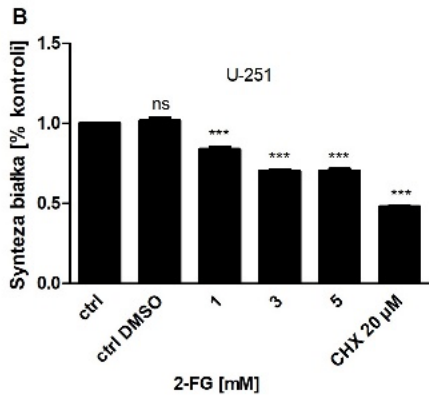
Uzyskane wyniki wskazują, iż zahamowanie proliferacji poprzedza zmiany żywotności komórek, gdyż efektywne stężenia 2-DG, WP1122, 2-FG, 2-FM, 2,2-diFG, 2-IM a także 2-BG

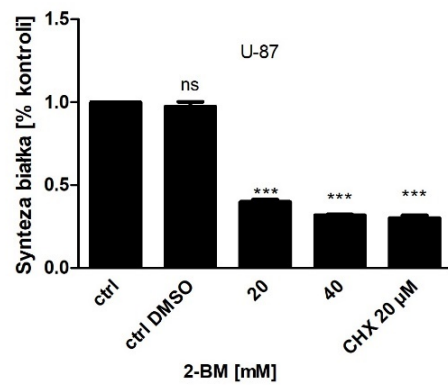
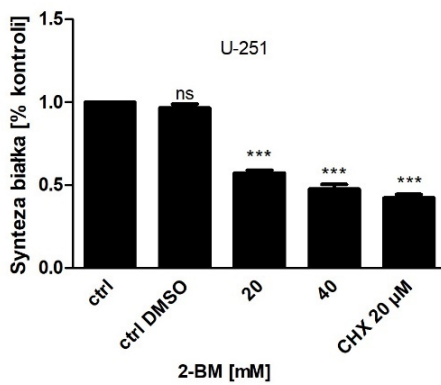
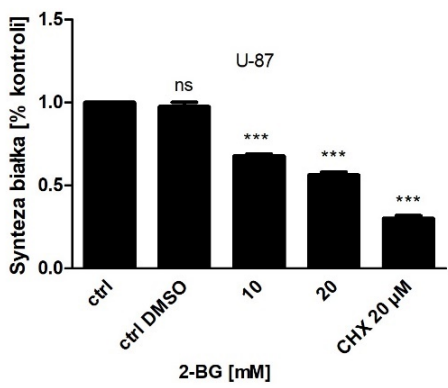
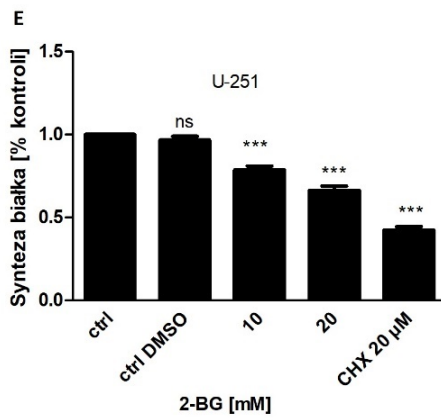
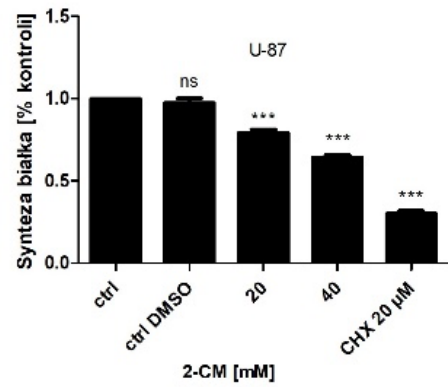
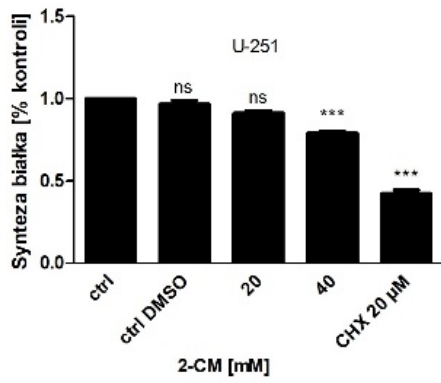
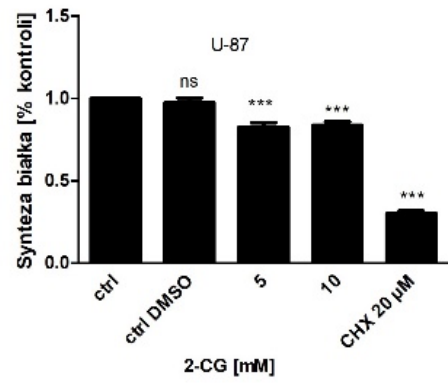
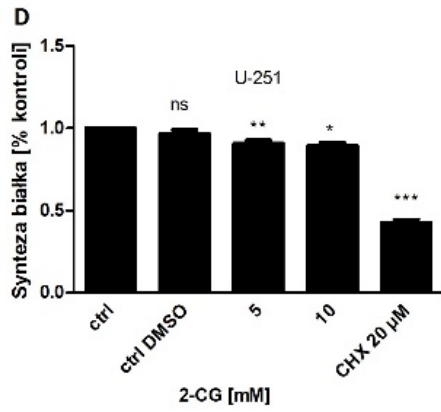
i 2-BM hamujące proliferację komórek obu linii są znacznie niższe niż te hamujące ich żywotność.

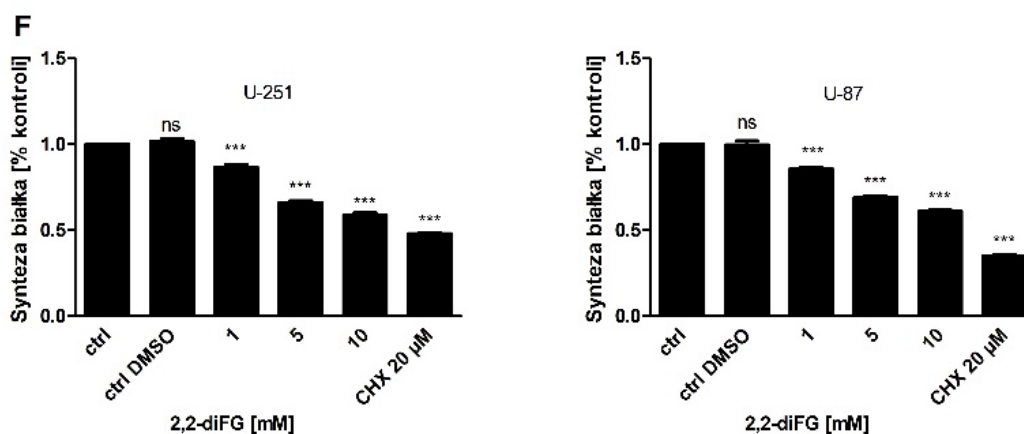
4.1.3. Wpływ halogenopochodnych na syntezę białka w komórkach GBM

Kolejną analizą mającą na celu potwierdzenie cytotoksycznych właściwości badanych związków była ocena hamowania biosyntezy białka testem z wykorzystaniem sulforodaminy B (SRB). SRB ma zdolność wiązania z aminokwasami wchodzącymi w skład białek, przez co jego stężenie w komórkach wprost proporcjonalnie koreluje z produkcją białek. W analizie zastosowano analogiczne do testu BrdU zakresy stężeń badanych pochodnych. Wykazano, że wraz ze wzrostem stężenia wszystkich badanych związków dochodzi do istotnego statystycznie zahamowania biosyntezy białek w obu liniach komórkowych po 72 h inkubacji (Rycina 17).









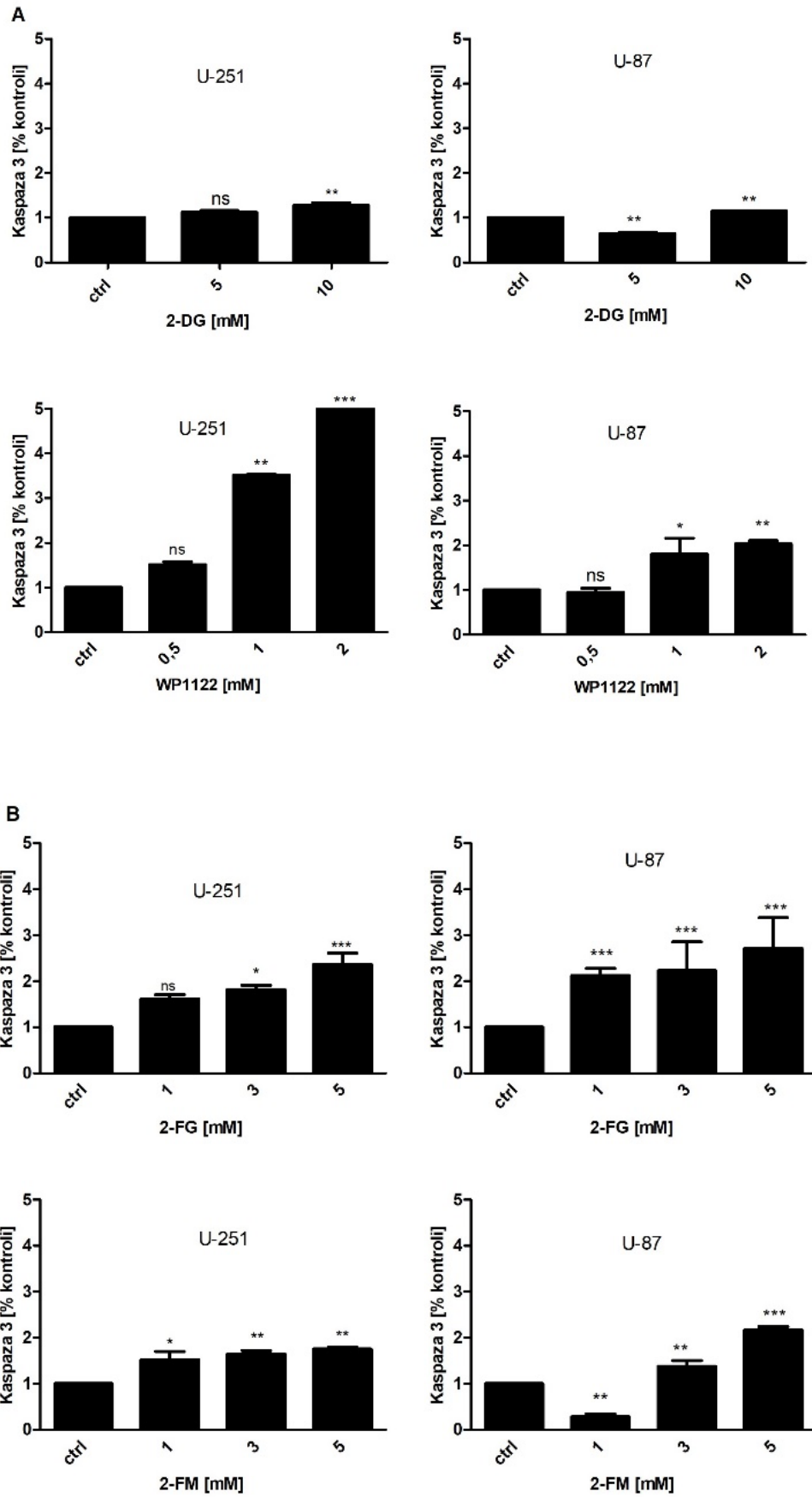
Rycina 17. Ocena natężenia biosyntezy białek w komórkach linii U-251 i U-87 z wykorzystaniem testu z barwnikiem SRB po 72 h inkubacji z odpowiednimi stężeniami A) 2-DG [2,5-20 mM] i WP1122 [0,5-5 mM], B) 2-FG [1-5 mM] i 2-FM [1-5 mM], C) 2-IG [1-10 mM] i 2-IM [1-10 mM], D) 2-CG [5-10 mM] i 2-CM [20-40 mM], E) 2-BG [10-20 mM] i 2-BM [20-40 mM], F) 2,2-diFG [0,5-5 mM]. Jako kontrolę pozytywną zastosowano CHX [20 µM]. Istotność różnic pomiędzy poszczególnymi stężeniami a kontrolą oznaczono * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ i *** $P < 0,001$.

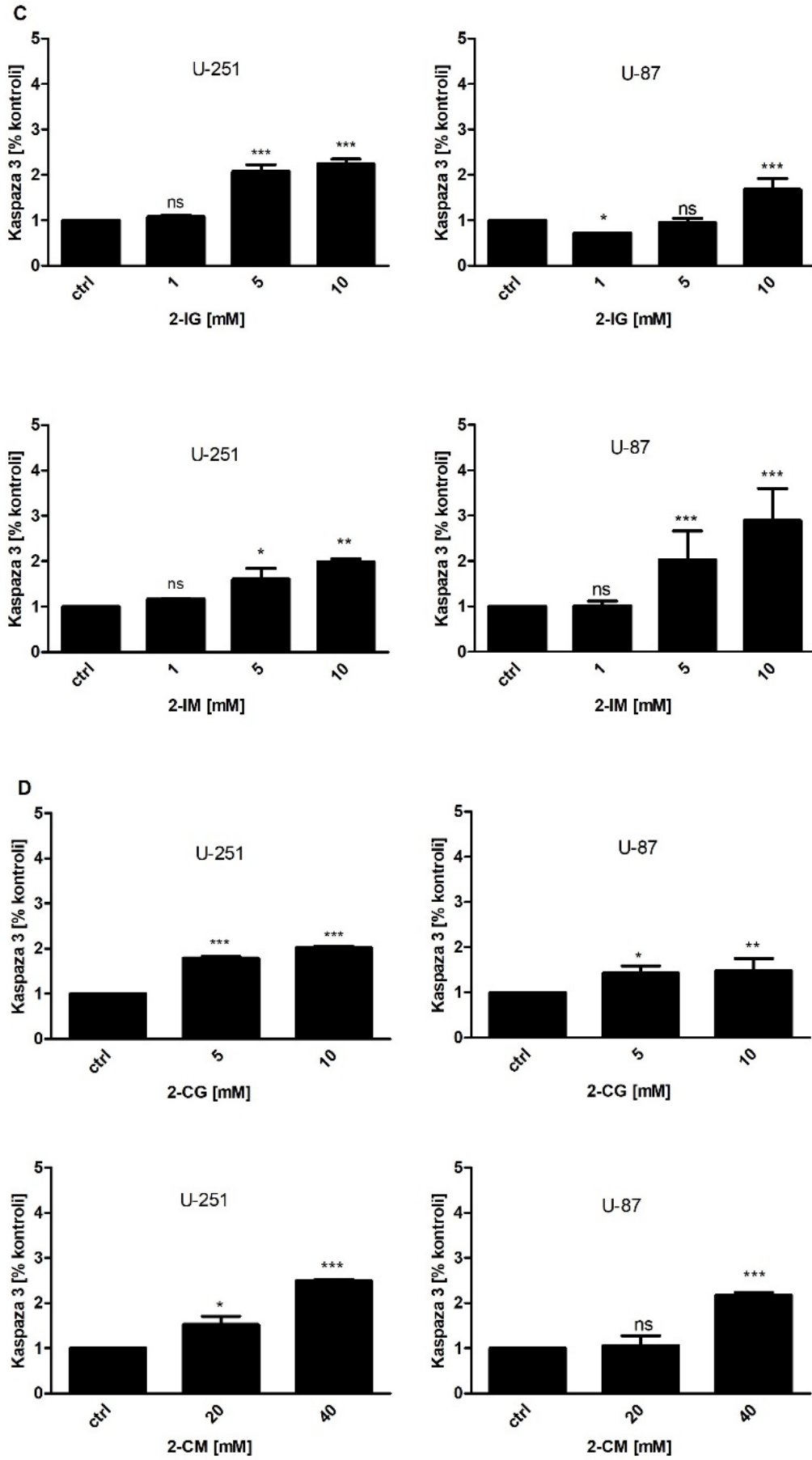
Jak wskazują uzyskane wyniki, efektywne stężenia badanych pochodnych 2-DG, hamujące biosyntezę białka korelują z zakresami stężeń obniżającymi żywotność komórek obu linii komórkowych.

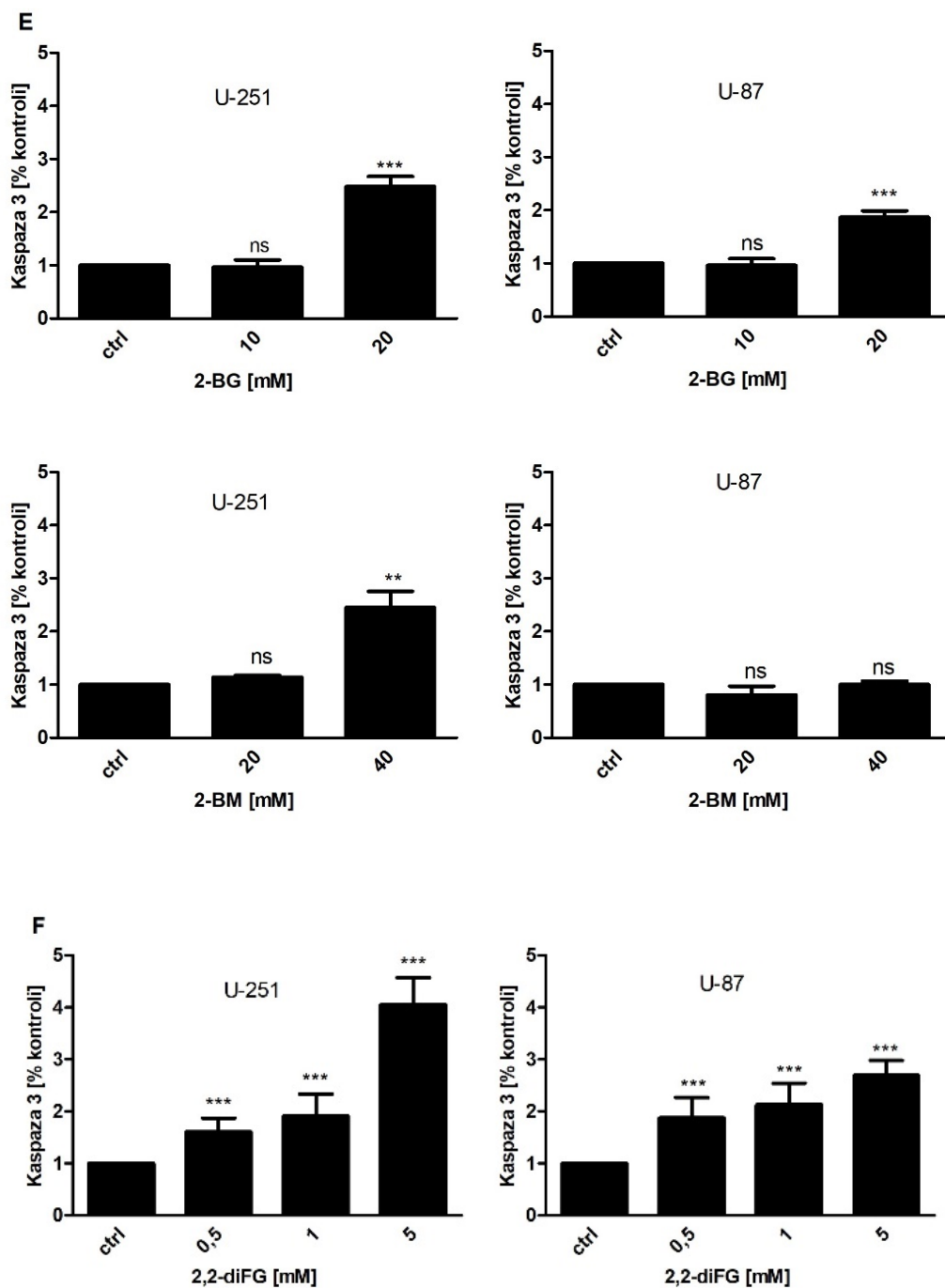
Na podstawie wykonanych testów cytotoksyczności można wnioskować, iż najwyższą aktywność przeciwnowotworową wykazuje *O*-acetylowana pochodna 2-DG - WP1122. Potwierdza to założenia, iż zastąpienie grup hydroksylowych grupami acetylowymi ułatwia transport związków przez błonę komórkową oraz zwiększa ich kumulację wewnątrz komórki. Uzyskane wyniki wskazały również, iż fluoro-pochodne 2-DG (2-FG i 2-FM) oraz 2-IM wykazują istotnie wyższą aktywność cytotoksyczną wobec komórek GBM niż chloro- i bromo-pochodne 2-DG.

4.1.4. Wpływ halogenopochodnych 2-DG na indukcję apoptozy w komórkach GBM

Aby ocenić udział procesu apoptozy w eliminacji komórek GBM, oceniono aktywność kaspazy 3 w lizatach komórek traktowanych wybranymi stężeniami badanych pochodnych: 2-DG [5-10 mM], WP1122 [0,5-2 mM], 2-FG [1-5 mM], 2-FM [1-5 mM], 2-IG [1-10 mM], 2-IM [1-10 mM], 2-CG [5-10 mM], 2-CM [20-40 mM], 2-BG [10-20 mM], 2-BM [20-40 mM], 2,2-diFG [0,5-5 mM] po 72 h inkubacji. Uzyskane wyniki ilustruje Rycina 18.







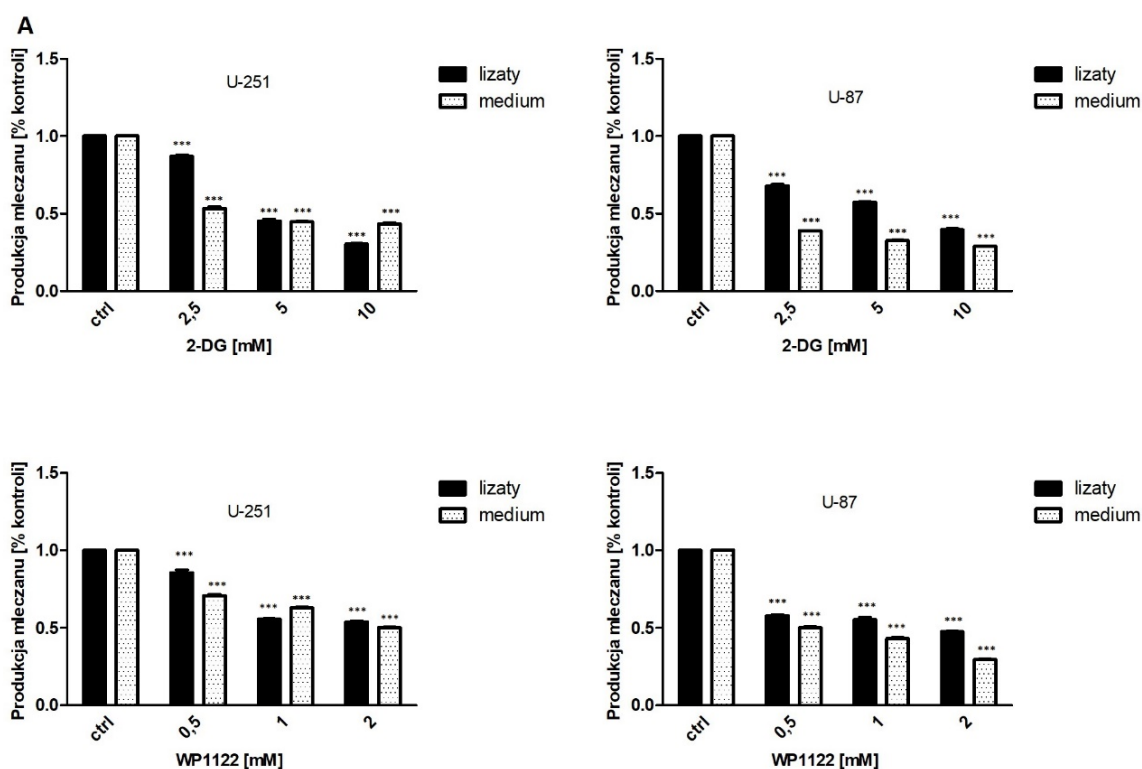
Rycina 18. Ocena aktywacji kaspazy 3 w komórkach linii U-251 i U-87 po 72 h inkubacji z wybranymi stężeniami A) 2-DG [5-10 mM] i WP1122 [0,5-2 mM], B) 2-FG [1-5 mM] i 2-FM [1-5 mM], C) 2-IG [1-10 mM] i 2-IM [1-10 mM], D) 2-CG [5-10 mM] i 2-CM [20-40 mM], E) 2-BG [10-20 mM] i 2-BM [20-40 mM], F) 2,2-diFG [0,5-5 mM]. Istotność różnic pomiędzy poszczególnymi stężeniami a kontrolą oznaczono * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ i *** $P < 0,001$.

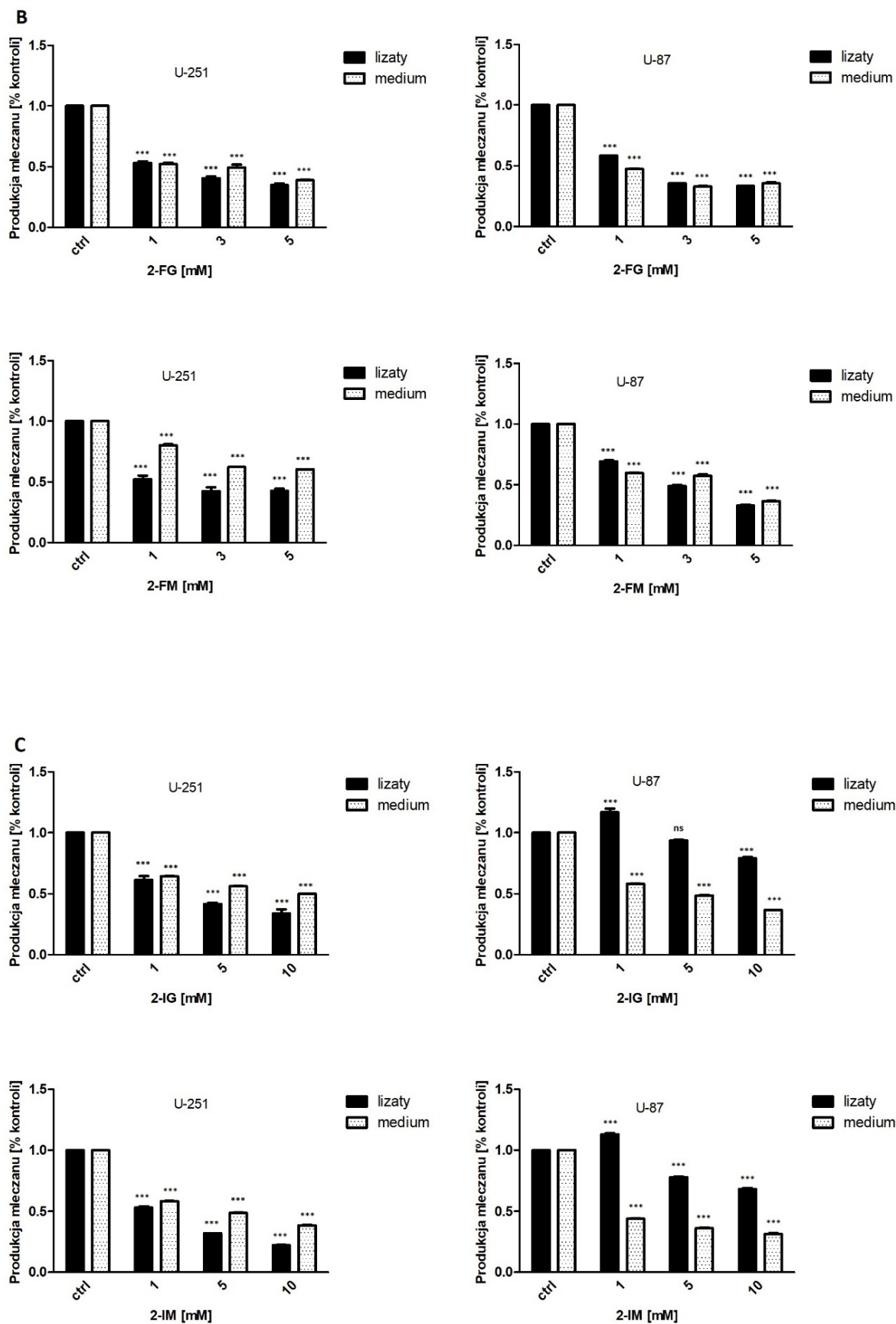
Uzyskane wyniki aktywacji efektorowej kaspazy 3 korespondują z testami cytotoksyczności, a obniżenie parametrów żywotności, proliferacji i poziomu biosyntezy białka

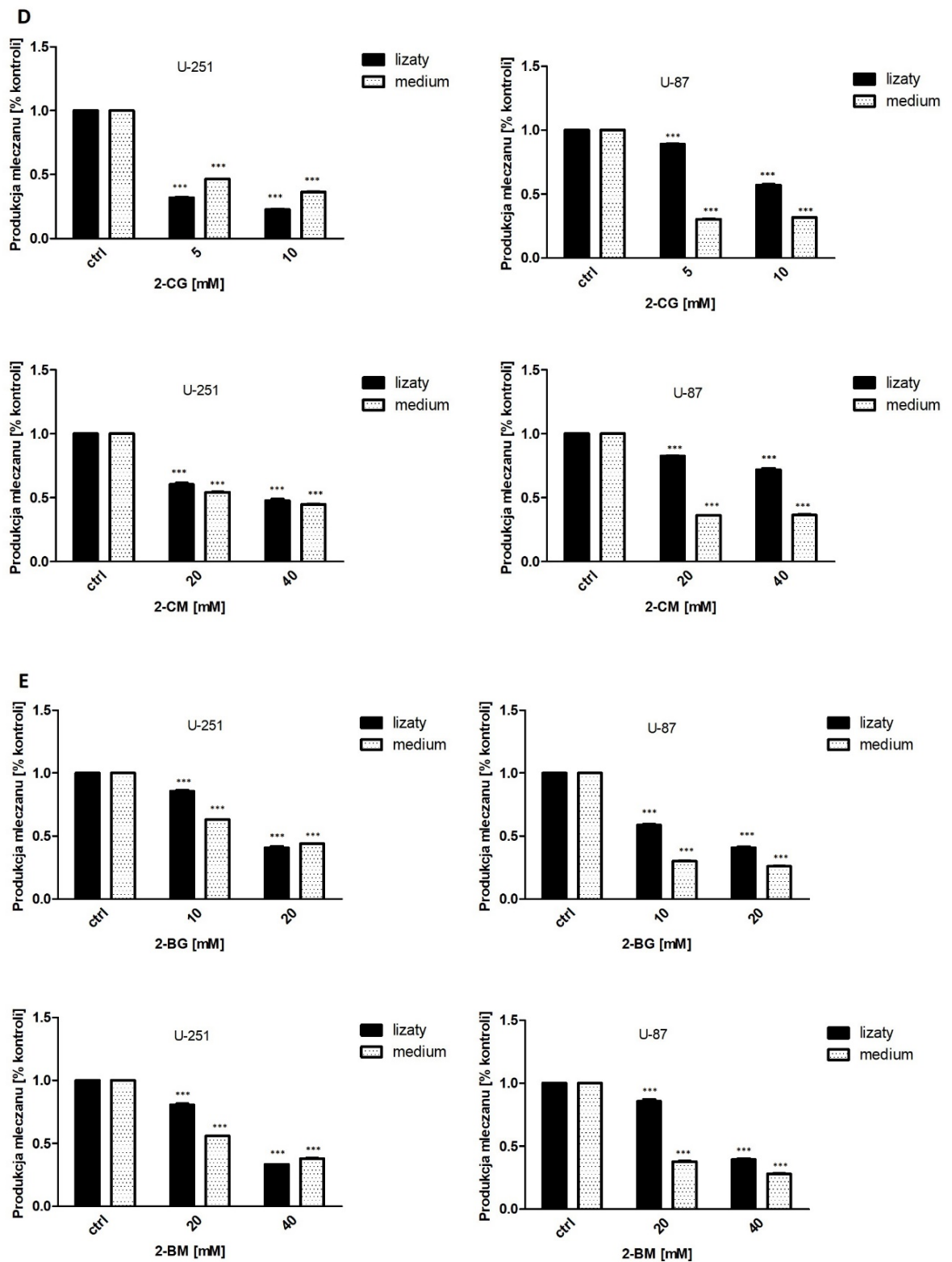
korelowało ze wzrostem natężenia procesu apoptozy w obu badanych liniach komórkowych. Największy wzrost aktywności kaspazy 3 wykazano w komórkach linii U-251 traktowanych WP1122 oraz 2,2-diFG. Spośród badanych związków, najmniejsza aktywność kaspazy 3 była oznaczona w komórkach traktowanych 2-DG, oraz jej bromo- i chloro-pochodnymi.

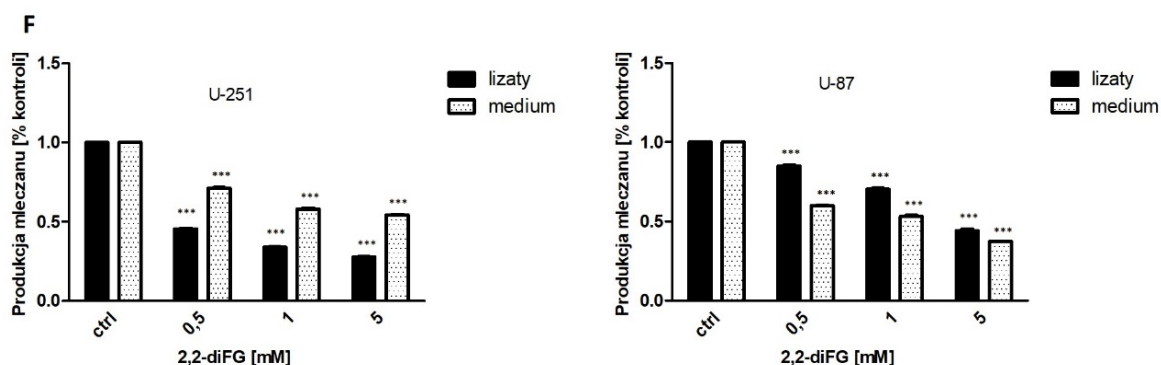
4.1.5. Ocena natężenia procesu glikolizy pod wpływem pochodnych 2-DG w komórkach GBM

W celu potwierdzenia zdolności hamowania procesu glikolizy w komórkach linii U-251 i U-87 przez 2-DG [2,5-10 mM] i jej pochodne: WP1122 [0,5-2 mM], 2-FG [1-5 mM], 2-FM [1-5 mM], 2-IG [1-10 mM], 2-IM [1-10 mM], 2-CG [5-10 mM], 2-CM [20-40 mM], 2-BG [10-20 mM], 2-BM [10-20 mM], 2,2-diFG [0,5-5 mM] po 72 h inkubacji, oznaczono poziom produkcji kwasu mlekowego, zarówno akumulowanego w komórkach jak i wydzielanego do pożywki hodowlanej (Rycina 19). Ilość wytworzonego kwasu mlekowego jest wprost proporcjonalna do natężenia intensywności procesu glikolizy.







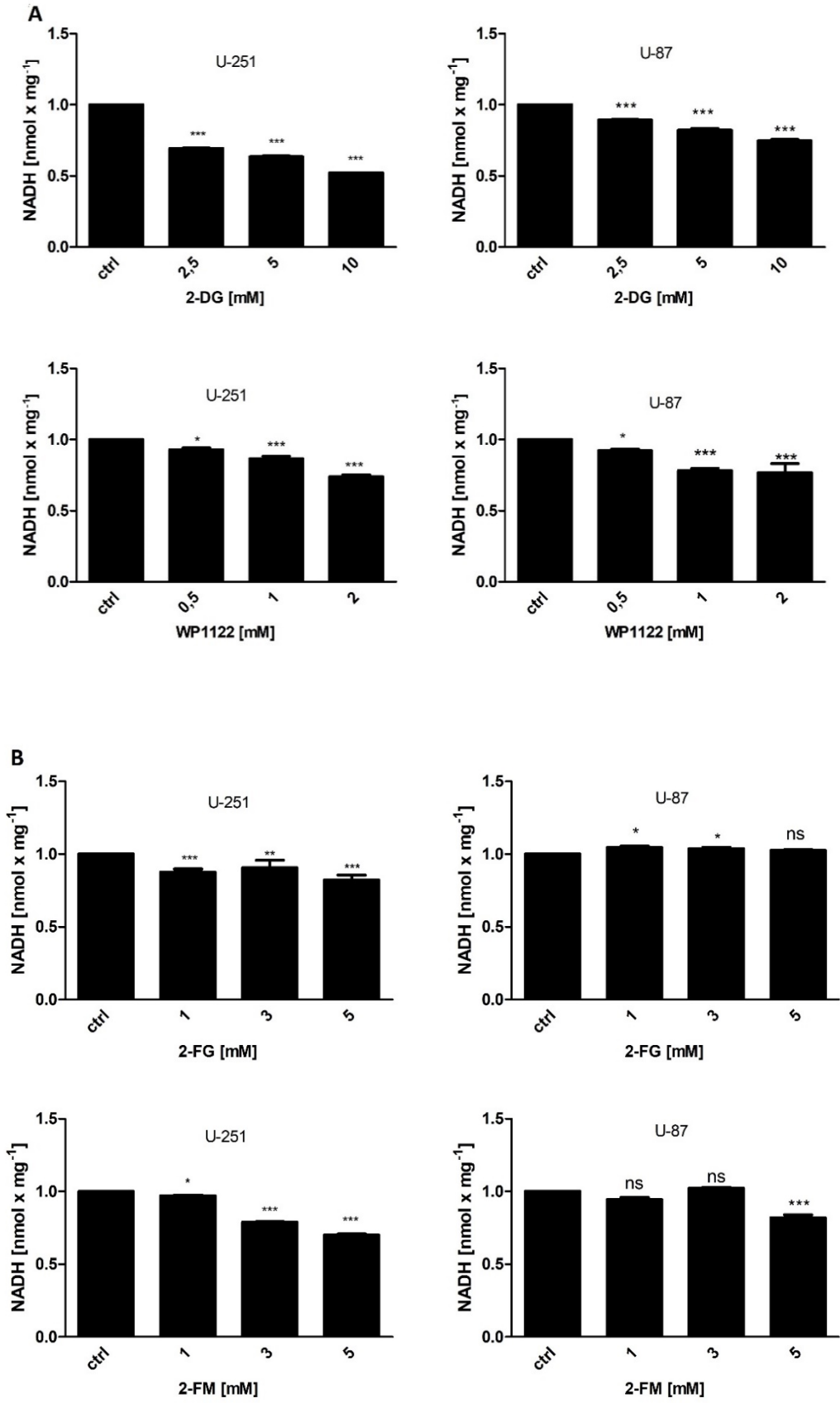


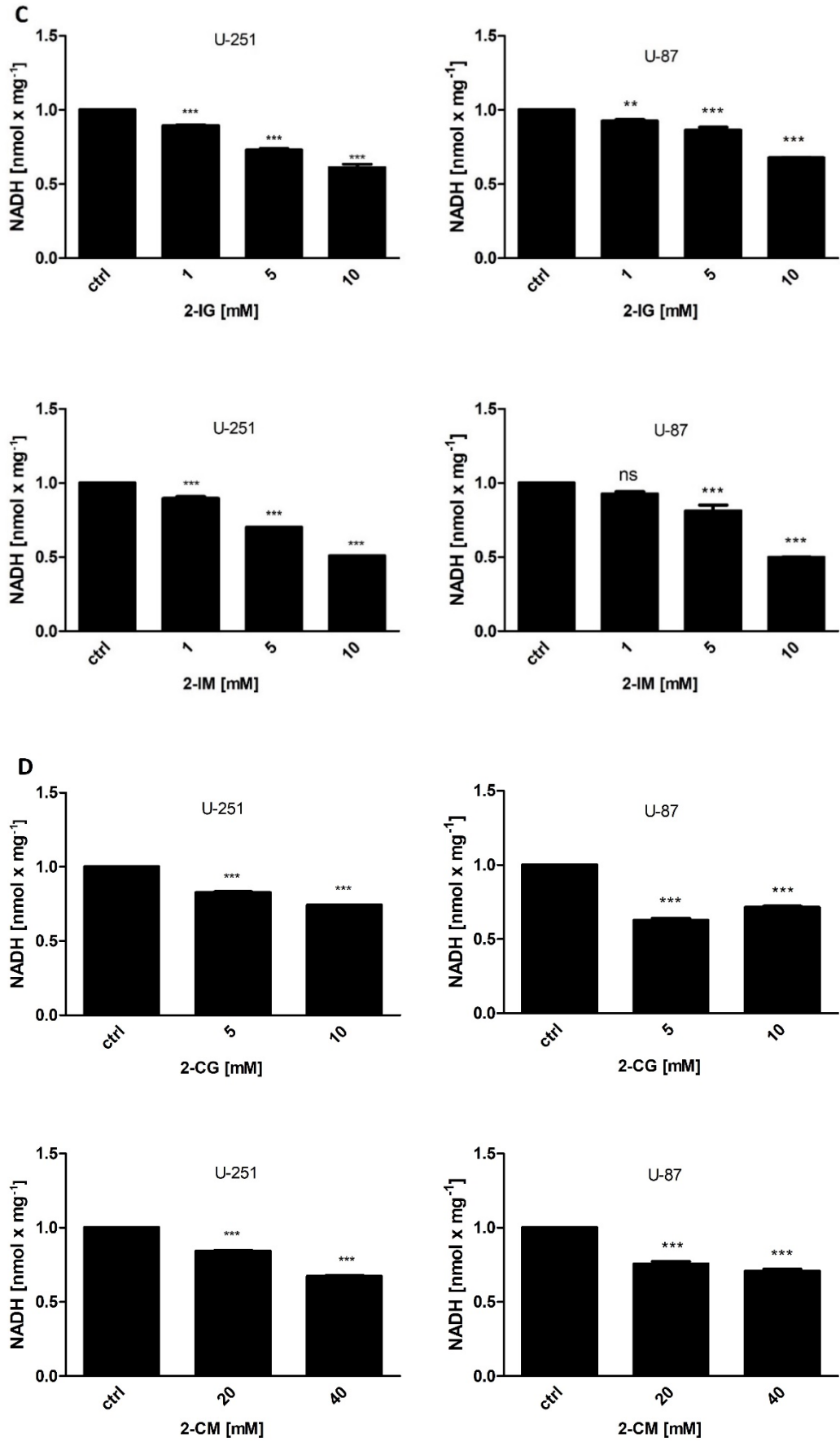
Rycina 19. Ocena natężenia syntezy kwasu mlekowego w komórkach linii U-251 i U-87 po 72 h inkubacji z odpowiednimi stężeniami A) 2-DG [2,5-10 mM] i WP1122 [0,5-2 mM], B) 2-FG [1-5 mM] i 2-FM [1-5 mM], C) 2-IG [1-10 mM] i 2-IM [1-10 mM], D) 2-CG [5-10 mM] i 2-CM [2-4- mM], E) 2-BG [10-20 mM] i 2-BM [10-20 mM], F) 2,2-diFG [0,5-5 mM]. Na wykresach zaznaczono ilość kwasu mlekowego w lizatach komórkowych oraz wydzielonego do medium hodowlanego. Istotność różnic pomiędzy poszczególnymi stężeniami a kontrolą oznaczono $*P < 0,05$, $**P < 0,01$ i $***P < 0,001$.

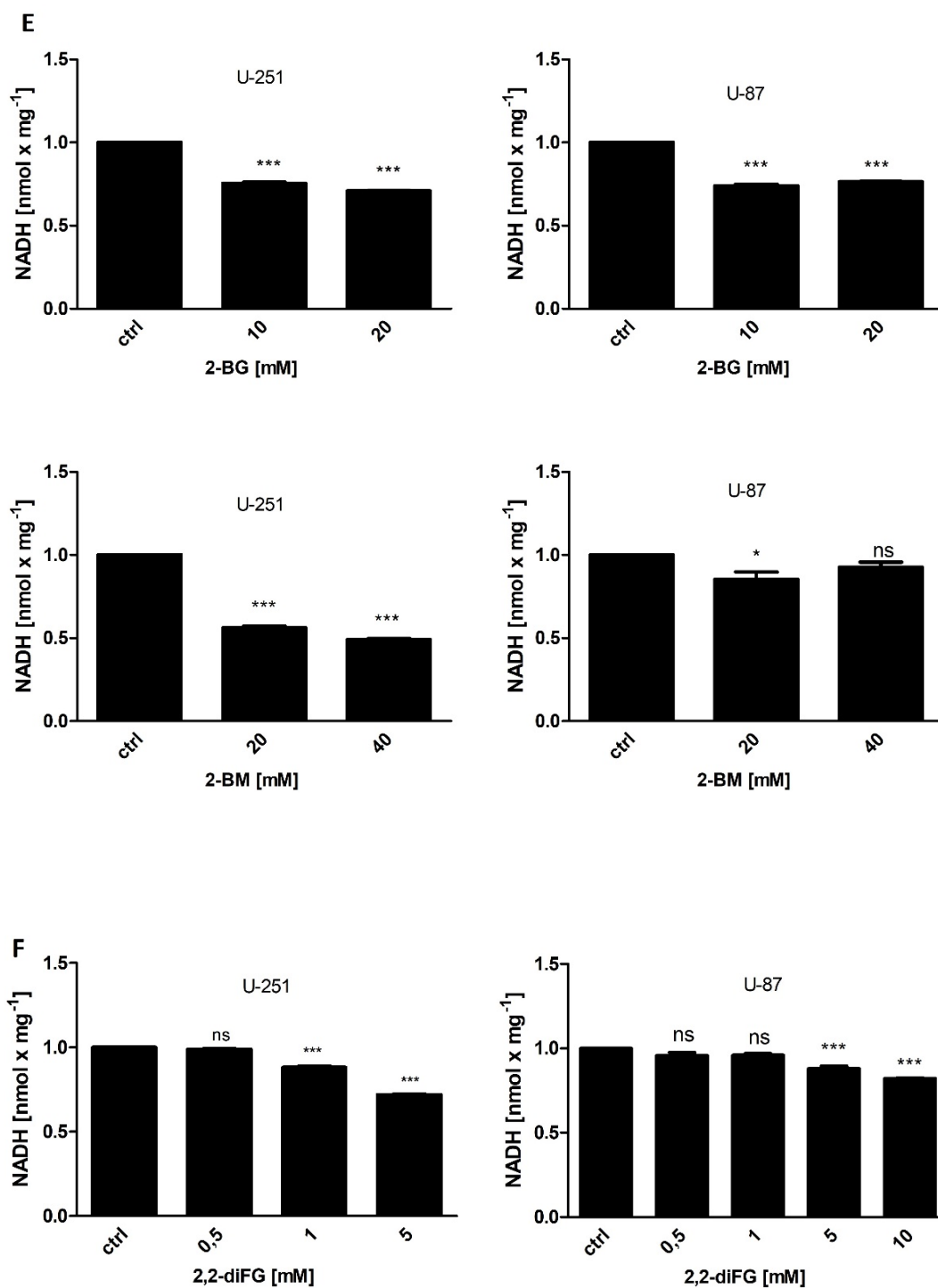
Przeprowadzona analiza wykazała, iż badane pochodne w zależności od dawki istotnie statystycznie obniżały wytwarzanie kwasu mlekowego w komórkach linii U-251 i U-87 oraz jego wydzielanie do medium hodowlanego, co koreluje ze zmniejszeniem poziomu glikolizy. Największa redukcja poziomu wytwarzanego w komórkach GBM kwasu mlekowego była obserwowana po traktowaniu 2-FG, 2-FM, 2-IM oraz 2,2-diFG, zwłaszcza w komórkach linii U-251. Co więcej, stwierdzono zależność między hamowaniem wytwarzania mleczanu w medium i lizatach a badaną linią komórkową. W przypadku linii U-87 silniejsze hamowanie wytwarzania mleczanu zaobserwowano w medium komórkowym, natomiast druga badana linia charakteryzowała się mniejszą ilością tego związku w lizatach komórkowych.

4.1.6. Wpływ pochodnych 2-DG na aktywność HK II w komórkach GBM linii U-87 i U-251

W celu weryfikacji wpływu pochodnych 2-DG na aktywność pierwszego enzymu w szlaku metabolicznym glukozy – heksokinazy II (HK II), przeprowadzono analizę z wykorzystaniem testu kolorymetrycznego Hexokinase Assay Kit. Poziom aktywności HK II był oceniany w lizatach komórkowych. W analizie zastosowano analogiczne do poprzednich eksperymentów zakresy stężeń badanych pochodnych. Wykazano, że wraz ze wzrostem stężenia związków dochodzi do istotnego statystycznie zahamowania aktywności heksokinazy II w obu liniach komórkowych po 72 h inkubacji (Rycina 20).



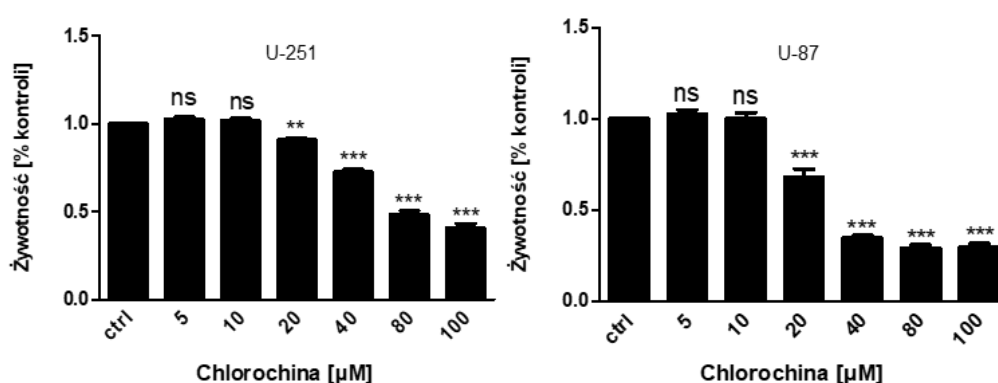




Rycina 20. Ocena wpływu badanych pochodnych A) 2-DG [2,5-10 mM] i WP1122 [0,5-2 mM], B) 2-FG [1-5 mM] i 2-FM [1-5 mM], C) 2-IG [1-10 mM] i 2-IM [1-10 mM], D) 2-CG [5-10 mM] i 2-CM [2-40 mM], E) 2-BG [10-20 mM] i 2-BM [20-40 mM], F) 2,2-diFG [0,5-10 mM] na aktywność heksokinazy II w komórkach linii U-251 i U-87 po 72 h inkubacji. Aktywność HK II jest proporcjonalna do ilości wydzielanego NADH. Istotność różnic pomiędzy poszczególnymi stężeniami a kontrolą oznaczono * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ i *** $P < 0,001$.

4.1.7. Wpływ halogenopochodnych 2-DG na indukcję autofagii w komórkach GBM

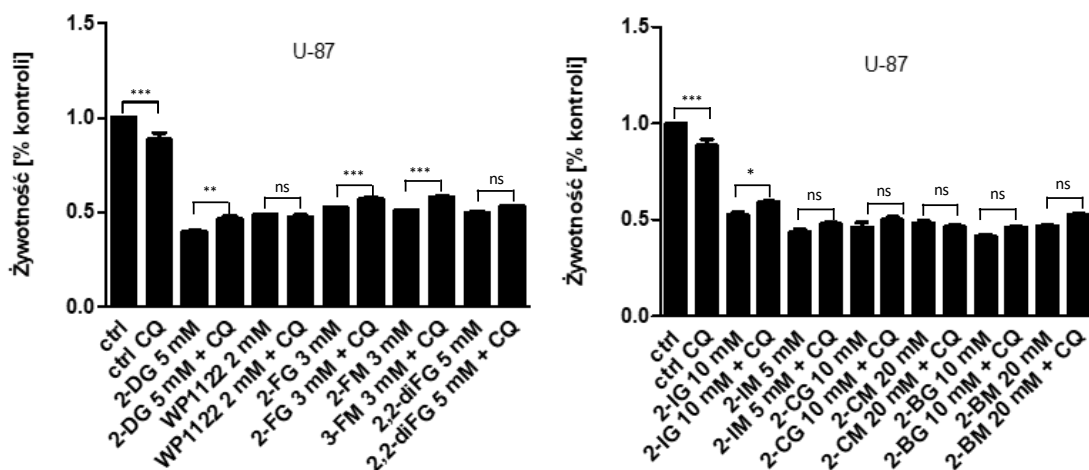
W celu zweryfikowania roli autofagii w cytotoksycznym mechanizmie działania analizowanych związków zastosowano chlorochinę (CQ), powszechnie wykorzystywany inhibitor fuzji lizosomów do autofagosomów, hamujący przebieg procesu autofagii. Efektywne, nietoksyczne stężenie CQ zostało wyznaczone w teście dawka-odpowieź, w którym oceniono wpływ wybranych stężeń CQ [5 -100 μM], na żywotność komórek U-87 i U-251 po 72 h inkubacji (Rycina 21).



Rycina 21. Żywotność komórek linii U-251 i U-87 mierzona za pomocą testu MTS po 72 h inkubacji ze wzrastającymi stężeniami chlorochiny (CQ) [5-100 μM]. Istotność różnic pomiędzy poszczególnymi stężeniami a kontrolą oznaczono * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ i *** $P < 0,001$.

Jak wskazuje Rycina 21, w obu badanych liniach komórkowych najwyższe nietoksyczne stężenie CQ wynosiło 10 μM .

Następnie przeprowadzono analizę żywotności komórek linii U-87 poddanych działaniu wyznaczonych uprzednio stężeń IC_{50} badanych pochodnych w obecności CQ [10 μM] (Rycina 22).

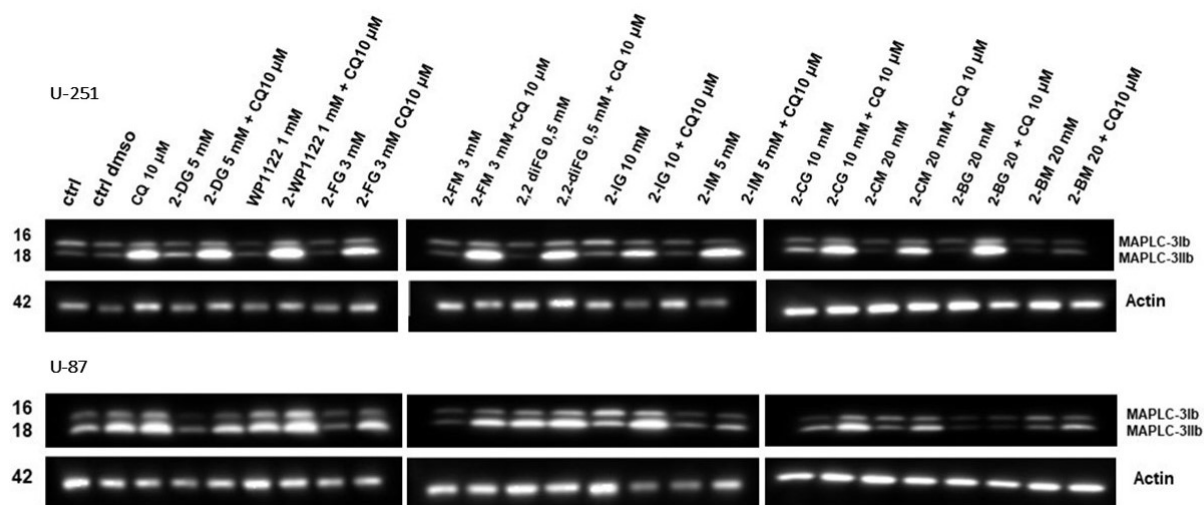


Rycina 22. Żywotność komórek linii U-87 mierzona za pomocą testu MTS po 72 h inkubacji z wyznaczonymi stężeniami IC₅₀ badanych związków: 2-DG [5 mM], WP1122 [1 mM], 2-FG [3 mM], 2-FM [3 mM], 2,2-diFG [5 mM], 2-IG [10 mM], 2-IM [5 mM], 2-CG [10 mM], 2-CM [20 mM], 2-BG [20 mM], 2-BM [20 mM] bez/z CQ [10 μM]. Istotność różnic pomiędzy poszczególnymi stężeniami a kontrolą oznaczono * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ i *** $P < 0,001$.

Jak wskazuje Rycina 22, obecność CQ działała istotnie protekcyjnie tylko w przypadku traktowania 2-FG, 2-FM oraz 2-DG, jednakże obserwowany wzrost żywotności (kilka procent) nie modyfikował zasadniczo efektów cytotoksycznych badanych związków. W przypadku pozostałych pochodnych 2-DG (WP1122, 2-IG, 2-IM, 2-CG, 2-CM, 2-BG, 2-BM, 2,2-diFG), obecność CQ nie wpływała istotnie statystycznie na żywotność komórek traktowanych badanymi związkami. Wyniki te wskazują, iż autofagia nie jest mechanizmem warunkującym cytotoksyczność badanych pochodnych 2-DG, gdyż jej zahamowanie nie ochroniło komórek przed ich cytotoksycznym oddziaływaniem.

Zahamowanie przez CQ fuzji lizosomów i autofagosomów, prowadzi do akumulacji w komórce niezdegradowanych białek. Jednym z nich jest białko MAP-LC3, zlokalizowane w błonach autofagosomów, uznawane za marker procesu autofagii w komórkach. Jak wskazuje analiza Western blot (Rycina 23), żadna z badanych pochodnych 2-DG nie indukowała wzrostu poziomu białka MAP-LC3, świadczącego o aktywacji procesu autofagii. Ponadto, obecność CQ we wszystkich traktowaniach indukowała zbliżonym wzrostem poziomu białka MAP-LC3, co świadczy o obecności w komórkach U-87 i U-251 fizjologicznego procesu autofagii o zbliżonej intensywności. Uzyskane wyniki Western blot korelują z obserwacjami uzyskanymi

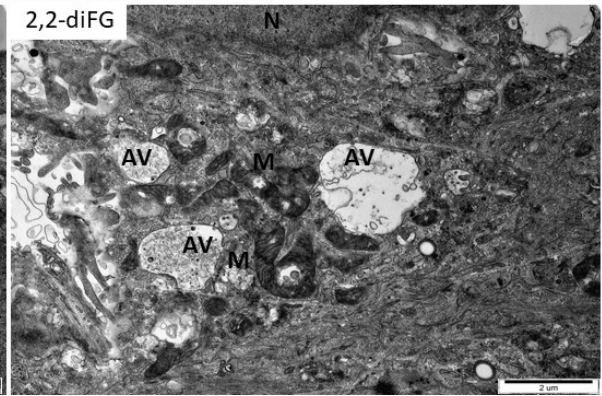
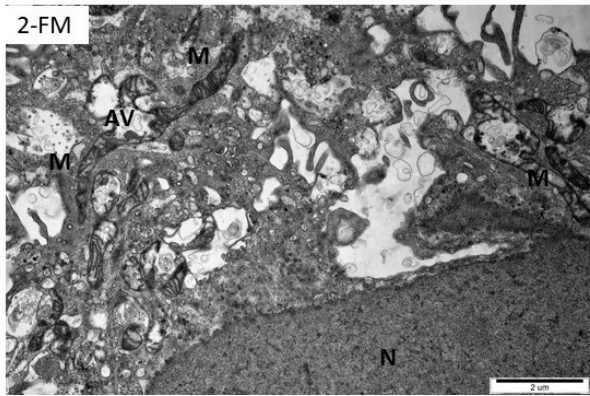
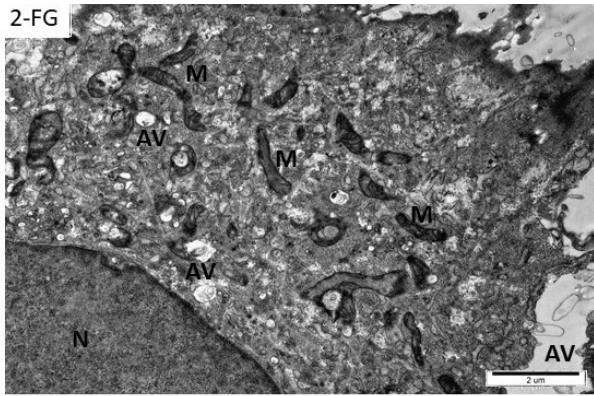
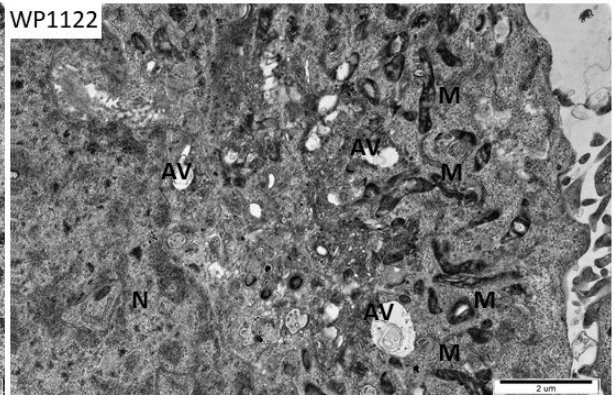
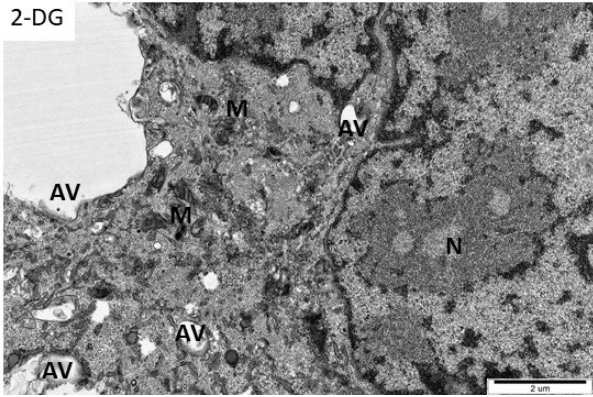
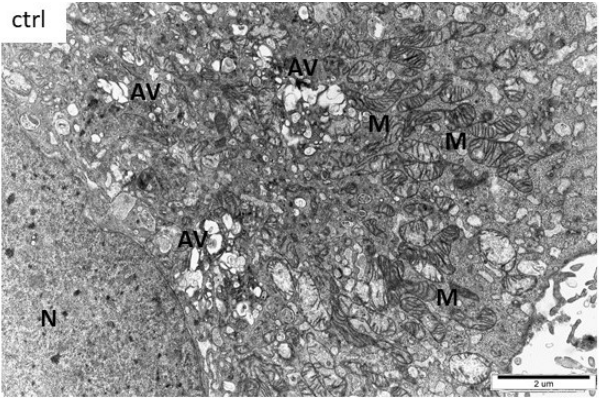
z analizy MTS i wnioskiem o braku istotnego udziału procesu autofagii w cytotoksycznym oddziaływaniu pochodnych 2-DG wobec komórek GBM.

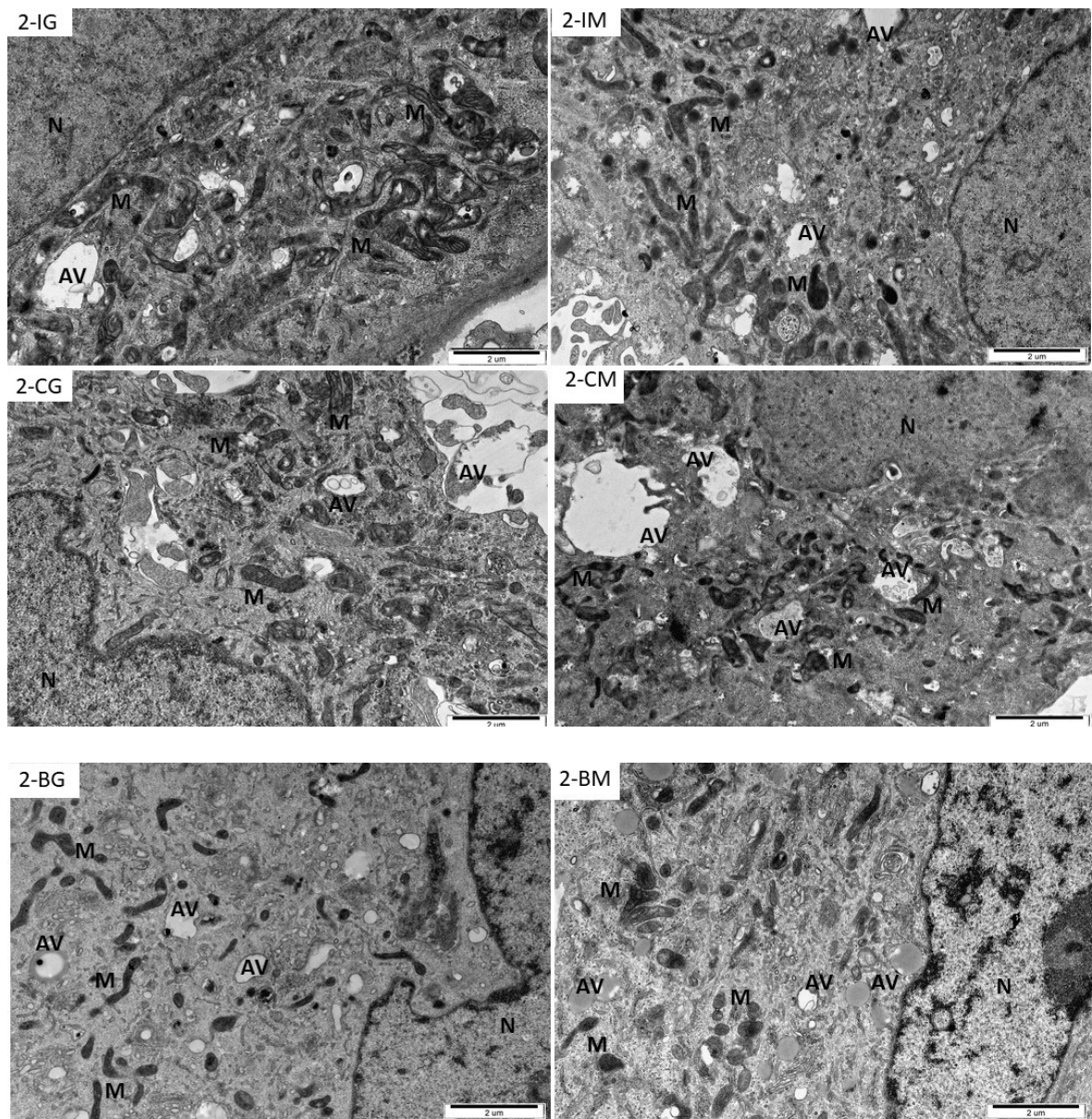


Rycina 23. Analiza Western blot ekspresji markera autofagii – białka MAP-LC3, po 72 h inkubacji z odpowiednimi stężeniami IC_{50} badanych związków 2-DG [5 mM], WP1122 [1 mM], 2-FG [3 mM], 2-FM [3 mM], 2,2-diFG [0,5 mM dla linii U-251 oraz 5 mM dla linii U-87], 2-IG [10 mM], 2-IM [5 mM], 2-CG [10 mM], 2-CM [20 mM], 2-BG [20 mM], 2-BM [20 mM] bez/z dodatkiem 10 μ M chlorochiny (CQ) A) w lizatach komórek linii U-251, B) w lizatach komórek linii U-87. Jako białko referencyjne oznaczono poziom aktyny.

4.1.8. Wpływ halogenopochodnych 2-DG na zmiany ultrastruktury badanych komórek

W celu oceny wpływu badanych pochodnych na morfologię komórek GBM, wykonano analizę ultrastruktury komórek z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) po 24 h inkubacji z wyznaczonymi stężeniami IC_{50} badanych związków: 2-DG [5 mM], WP1122 [1 mM], 2-FG [3 mM], 2-FM [3 mM], 2,2-diFG [0,5 mM dla linii U251 oraz 5 mM dla linii U87], 2-IG [10 mM], 2-IM [5 mM], 2-CG [10 mM], 2-CM [20 mM], 2-BG [20 mM], 2-BM [20 mM] oraz komórek nietraktowanych. Rycina 24 przedstawia reprezentatywne zdjęcia TEM morfologii komórek.





Rycina 24. Obraz ultrastruktury komórek nietraktowanych (ctrl) oraz traktowanych 2-DG [5 mM], WP1122 [2 mM], 2-FG [3 mM], 2-FM [3 mM], 2,2-diFG [5 mM], 2-IG [10 mM], 2-IM [5 mM], 2-CG [10 mM], 2-CM [20 mM], 2-BG [20 mM], 2-BM [20 mM] przez 24 h inkubacji. Na zdjęciach oznaczono wybrane struktury komórkowe: N- jądro komórkowe, M – mitochondria, AV -wakuole autofagowe.

Analiza morfologii komórek ujawniła obecność licznych wakuoli autofagowych, organelli typowych dla procesu makroautofagii, zarówno w komórkach kontrolnych jak i traktowanych badanymi pochodnymi. Szczególną uwagę zwrócili jednak zmiany morfologiczne zachodzące w mitochondriach. Pod wpływem 24 h inkubacji komórek GBM ze stężeniami IC_{50} pochodnych 2-DG, zaobserwowano obkurczanie oraz zwiększenie gęstości elektronowej tych organelli, widoczne jako ciemniejsze zabarwienie. Ponadto mitochondria przybierały wydłużony kształt oraz łączyły się ze sobą. Zmiany te wskazują na zaburzenia

aktywności fizjologicznej mitochondriów, jednakże identyfikacja mechanizmów dysfunkcji wymaga dalszych analiz.

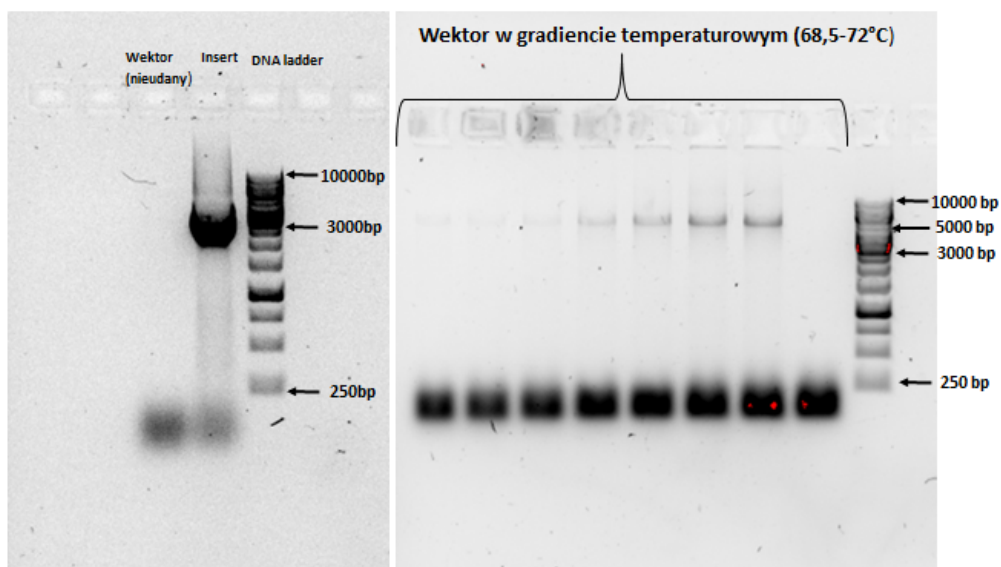
Podsumowując badania cytotoksycznego oddziaływania halo- i acetylo-pochodnych 2-DG na modelu *in vitro* linii U-87 i U-251 glejaka wykazano, iż oddziaływanie pochodnych jest zależne od rodzaju, ale nie orientacji, podstawnika w strukturze 2-DG (za wyjątkiem jodopochodnych). Wśród analogów 2-DG najsilniejsze efekty cytotoksyczne zaobserwowano w przypadku WP1122, 2,2-diFG, 2-FM, 2-FG a także 2-IM podczas gdy bromo- i chloro-pochodne były aktywne tylko w bardzo wysokim stężeniu, niemożliwym do osiągnięcia w warunkach fizjologicznych. Modyfikacją, która znacząco poprawia aktywność biologiczną 2-DG jest acetylacja cząsteczki. WP1122, diacetylowana pochodna 2-DG wykazywała wysoką aktywność przeciwnowotworową na obu liniach komórkowych w stężeniach istotnie niższych niż 2-DG.

Aby zweryfikować podłoże zróżnicowanego oddziaływania badanych pochodnych wykonano analizy biochemiczne, mające na celu identyfikację oddziaływania badanych pochodnych 2-DG z HK II. Można bowiem założyć, iż różna aktywność cytotoksyczna halogenopochodnych jest uzależniona od ich zdolności do wiązania i hamowania aktywności HK II, która może być zależna od wielkości podstawnika.

4.2. Badania biochemiczne i fizykochemiczne

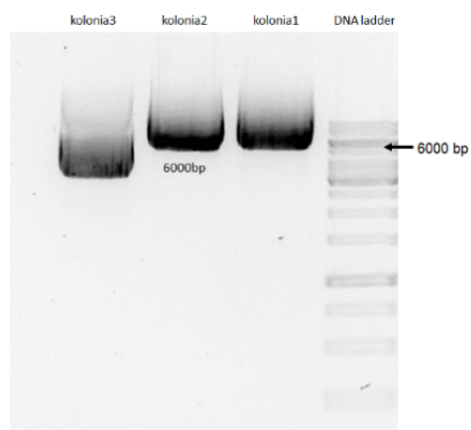
4.2.1. Produkcja rekombinowanego białka heksokinazy II

W celu oceny zdolności oddziaływania i hamowania aktywności heksokinazy przez badane pochodne 2-DG oraz poznania mechanizmu tych oddziaływań, podjęto próbę krystalizacji kompleksów pochodnych 2-DG z heksokinazą II (HK II). Produkcja białka rekombinowanego HK II została przeprowadzona w systemie bakteryjnym z wykorzystaniem szczepu *E. coli* BL21-(DE3). Gen HKII został wprowadzony do pMCSG7 przy wykorzystaniu techniki Gibson Assembly. Plazmid zawierał również gen oporności na ampicylinę, który umożliwiał selekcję transformowanych klonów bakterii. Rycina 25 przedstawia mapę plazmidu wykorzystanego do transfekcji.



Rycina 26. Rozdział elektroforetyczny insertu oraz wektora po reakcji PCR.

Następnie przeprowadzono klonowanie molekularne, czyli wprowadzenie insertu oraz wektora do plazmidu pMCSG7, metodą Gibson Assembly i transformowano tak uzyskane DNA do szczepu ekspresyjnego bakterii kompetentnych *E. coli*. Metodą rozdziału elektroforetycznego upewniono się, że transformowane kolonie zawierają wklonowane DNA (Rycina 27), którego sekwencję potwierdzono sekwencjonowaniem metodą Sangera.

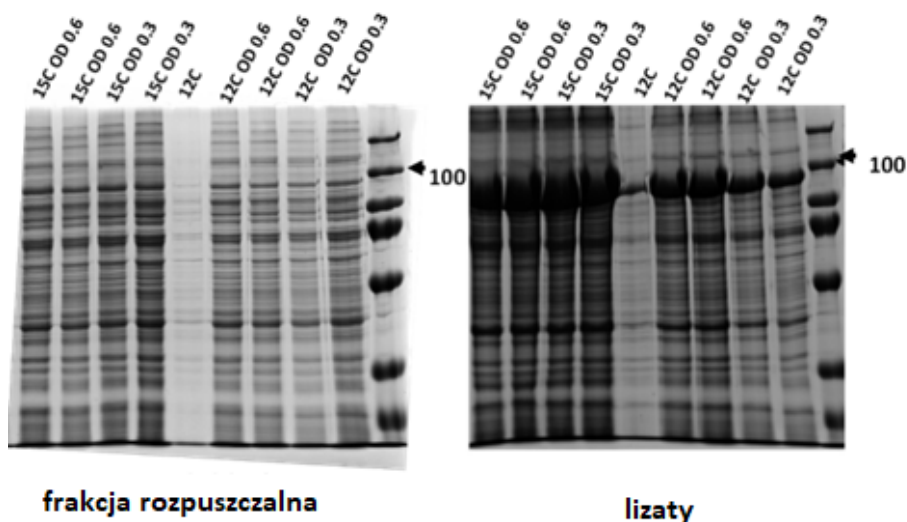


Rycina 27. Rozdział elektroforetyczny kolonii bakterii kompetentnych *E. coli* zawierających wklonowany materiał genetyczny.

Prawidłowy wynik sekwencjonowania pozwolił na przeprowadzenie kolejnego etapu procesu, którym była transformacja DNA do szczepu ekspresyjnego i testowanie warunków ekspresji białka pod względem stężenia IPTG, temperatury hodowli oraz gęstości bakterii, przy

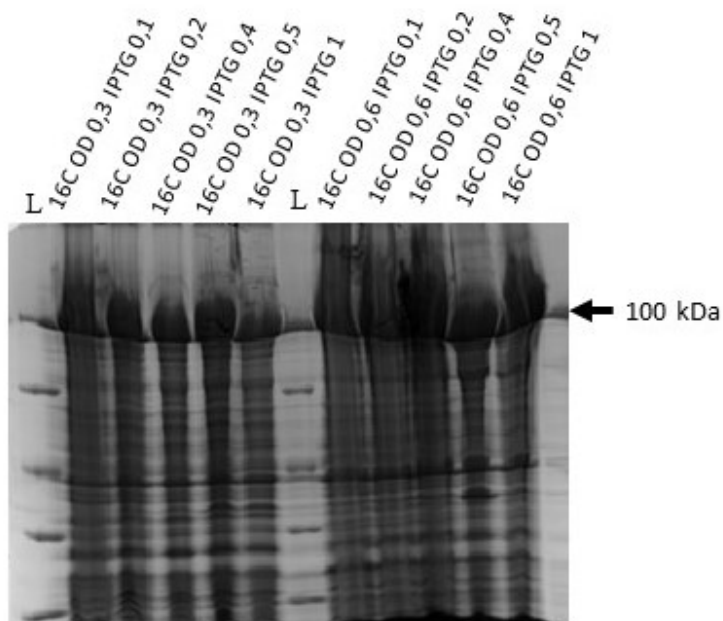
której indukowano ekspresję. Celem optymalizacji było uzyskanie najwyższej ekspresji białka HK II.

Jak wskazuje Rycina 28, większość białka HK II (oznaczone strzałką) znajdowała się w nierozpuszczalnych ciałkach inkluzyjnych a nie frakcji rozpuszczalnej, co znacznie utrudniało jego oczyszczanie i redukowało wydajność ekspresji.



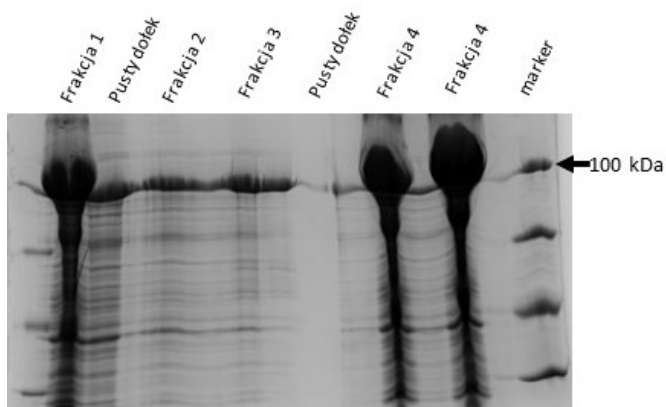
Rycina 28. Rozdział elektroforetyczny supernatantu oraz lizatów komórkowych otrzymanych w wyniku testowania różnych warunków ekspresji HK II. Nad ścieżkami oznaczono testowane warunki: temperatura 15 °C lub 12 °C oraz gęstość hodowli: 0,3 lub 0,6 OD₆₀₀.

W związku z niską wydajnością ekspresji heksokinazy II w formie rozpuszczalnej, w celu poprawy tej ekspresji, w plazmidzie wprowadzono pojedynczą mutację polegającą na delecji pierwszych siedmiu aminokwasów na N-końcu. W tym celu zaprojektowano i zamówiono nowe startery i przeprowadzono reakcję PCR oraz powtórzono wszystkie etapy procesu. Obraz ekspresji białka HK II po przeprowadzeniu procesu ukierunkowanej mutagenyzy obrazuje rozdział elektroforetyczny na Rycinie 29.



Rycina 29. Ekspresja heksokinazy II z plazmidu po mutageniezie we frakcji rozpuszczalnej (supernatant) lizatu bakteryjnego dla kilku przykładowych badanych warunków. Nad ścieżkami oznaczono testowane warunki: temperatura 16 °C, gęstość hodowli: 0,3 lub 0,6 OD₆₀₀, oraz stężenia IPTG: 0,1; 0,2; 0,4; 0,5 lub 1 μM, L- marker.

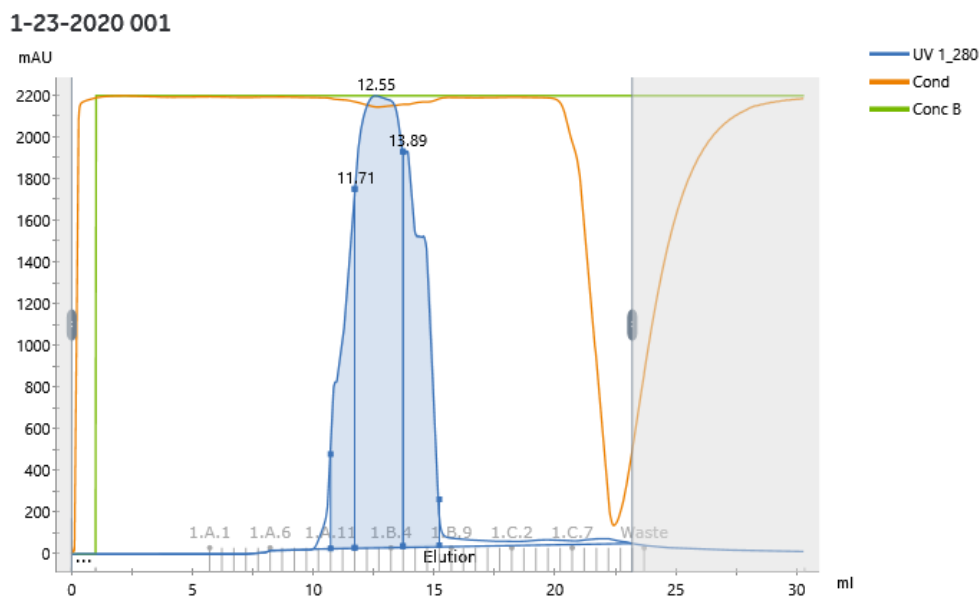
Uzyskanie wysokiej ekspresji białka HK II w rozpuszczalnej frakcji lizatu bakteryjnego pozwoliło na jego produkcję w dużej skali (2 L), a następnie jego oczyszczanie metodą chromatografii powinowactwa IMAC (Rycina 30). Uzyskane frakcje analizowano elektroforetycznie. Uzyskano wysoką ekspresję białka w lizatach komórkowych, ale także we frakcji po oczyszczaniu (po elucji z imidazolem). Wybrana metoda wstępnego oczyszczania okazała się optymalna dla badanego białka.



Rycina 30. Frakcje uzyskane po oczyszczaniu supernatantu za pomocą chromatografii IMAC: frakcja 1- lizat komórkowy, frakcje 2,3- frakcje uzyskane przez płukanie kolumny buforem do lizy, frakcja 4- frakcja uzyskana z elucji z imidazolem.

W kolejnym etapie produkcji, białko oczyszczano metodą chromatografii wykluczania (SEC). W metodzie SEC kolejność wymywanych białek związana jest z zatrzymywaniem cząsteczek w porach złoza, a czas ich przebywania wewnątrz porów jest proporcjonalny do ich wielkości. Frakcje odpowiadające czystemu rekombinowanemu białku HK II oczyszczone metodą chromatografii IMAC, a następnie zatężone nakładano na kolumnę GE Superdex 200 16/60 w ilości 300 μ l. Szybkość przepływu utrzymywano w zakresie 0,5 ml/min. Próbkę odpowiadającą eluowanym frakcjom w zakresie masy cząsteczkowej HK II zbierano i przeprowadzono ich rozdział elektroforetyczny celem oceny czystości. Jak wskazuje Rycina 31 uzyskano czyste prążki białkowe zgodne z rozmiarem cząsteczki dimeru HK II (ok. 100 kDa).

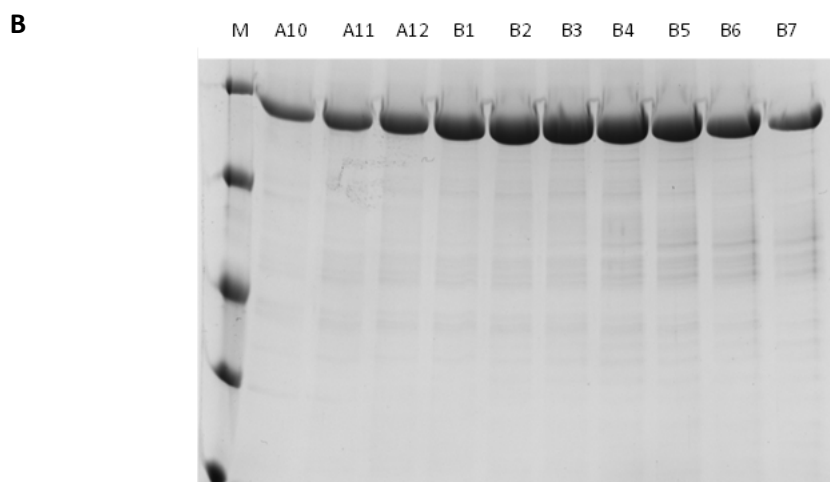
A



Peak Table

Peak	Retention (ml)	Area (ml ² mAU)	Area %	Ext coeff. (mg ml ⁻¹ cm ⁻¹)	Fraction(s)	Volume (ml)
Peak A	11.712	1070	14.76	0.548	1.A.11 - 1.A.12	0.999
Peak B	12.551	4161	57.37	0.548	1.B.1 - 1.B.4	2.000
Peak C	13.888	2022	27.88	0.548	1.B.5 - 1.B.7	1.500

Amount (mg)	Concentration (mg/ml)	Conductivity (mS/cm)
9.767	9.772	48.32
37.970	18.986	47.75
18.451	12.296	48.06



Rycina 31. A) Profil elucji rozdziału SEC oczyszczonego preparatu białka HK II. Frakcja wypływająca przy 12-14 ml odpowiada masie cząsteczkowej 100 kDa B) Rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE kolejnych frakcji uzyskanych po oczyszczeniu chromatografią SEC zebranych w zakresie piku.

W wyniku przeprowadzenia powyższych prac wyprodukowano rekombinowane białko ludzkiej heksokinazy II, które w kolejnych etapach miało zostać wykorzystane do ustalenia charakteru oddziaływania badanych pochodnych z HK II na podstawie ich struktur krystalograficznych.

4.2.2. Próby krystalizacji białka HK II

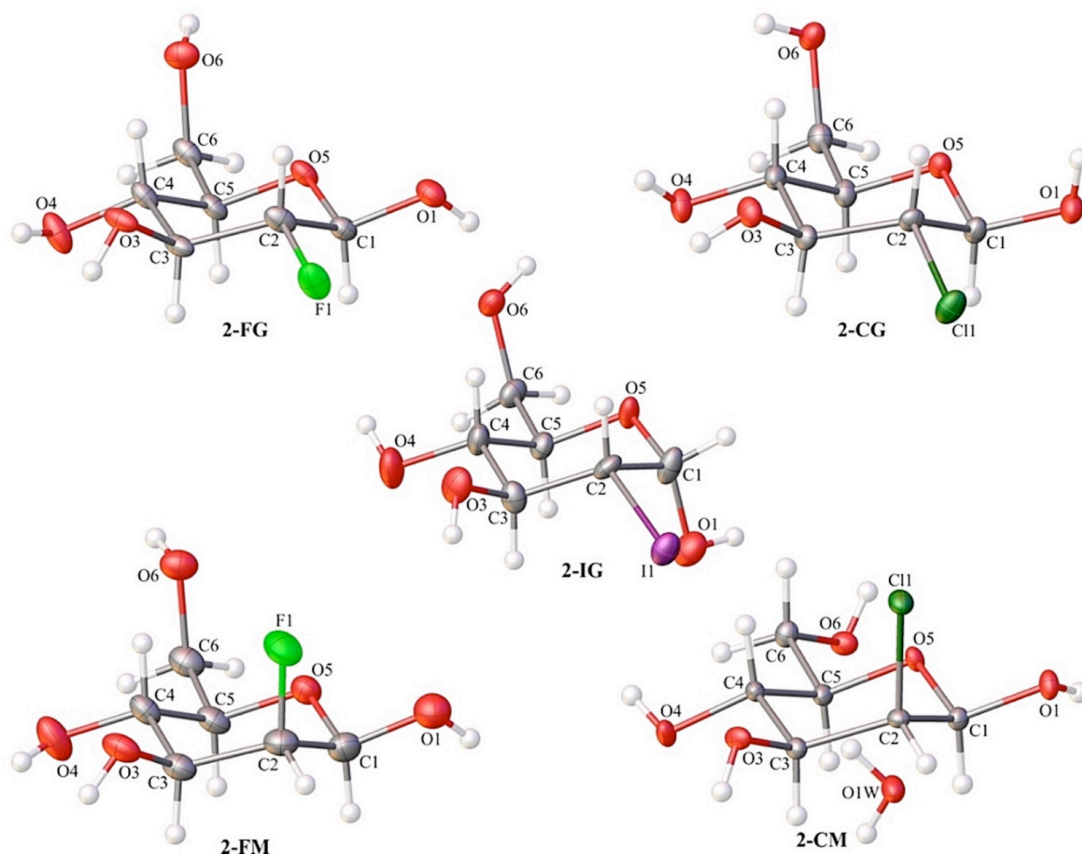
W celu ustalenia charakteru oddziaływania badanych pochodnych z HK II, podjęto próby krystalizacji uzyskanego białka HK II. Rozpuszczalniki oraz warunki prowadzenia procesu krystalizacji opisano w rozdziale Materiały i Metody. Krystalizacja była prowadzona przez okres kilku miesięcy, ale dotychczas nie zaobserwowano powstawania kryształów o jakości wystarczającej do badań krystalograficznych przy użyciu krystalografii rentgenowskiej. Krystalizacja białek jest procesem niezwykle trudnym, a uzyskanie satysfakcjonujących kryształów jest bardzo czasochłonne. Dotychczas nie udało się uzyskać kryształów spełniających wymagania do przeprowadzenia analiz krystalograficznych, jednakże w ramach projektu trwają również prace nad dokowaniem oddziałujących halogenopochodnych do centrum aktywnego HK II z wykorzystaniem alternatywnych metod modelowania molekularnego oraz spektroskopii NMR.

4.2.3. Analiza struktury krystalicznej pochodnych 2-DG

W celu ustalenia struktury badanych pochodnych 2-DG, wykonano próby uzyskania odpowiednich do analizy kryształów poprzez krystalizację metodą stopniowego chłodzenia z

wykorzystaniem szeregu rozpuszczalników. Próby krystalizacji związków z roztworu wodnego kończyły się uzyskiwaniem lepkiej fazy amorficznej, dopiero krystalizacja z rozpuszczalników organicznych (etanol, izopropanol) pozwoliła na otrzymanie mieszaniny krystalicznej oraz amorficznej fazy szklistej. W przypadku każdego z badanych związków faza krystaliczna składała się z agregatów, w których obserwowano monokryształy. Kryształy wykazywały pokrój igiełkowy lub kolumnowy. Badania za pomocą krystalografii rentgenowskiej wykazały, że wprowadzenie atomu halogenku nie powoduje istotnych zmian konformacyjnych w porównaniu do 2-DG, a wszystkie zbadane związki występują w najstabilniejszej i najbardziej korzystnej energetycznie konformacji krzesłowej typu 4C_1 .

Analiza rentgenostrukturalna dodatkowo potwierdziła tożsamość wszystkich badanych związków. Większość z nich wykryła w rombowej grupie przestrzennej $P2_12_12_1$, która jest często spotykana wśród kryształów sacharydów. Jedynym wyjątkiem była cząsteczka 2-CM, która tworzyła kryształy w układzie jednoskośnym w grupie przestrzennej $P2_1$. W przypadku wszystkich badanych związków, asymetryczna jednostka sieci krystalicznej zawierała jedną cząsteczkę związku (Rycina 32).



Rycina 32. Struktury krystaliczne badanych związków ze schematem numeracji atomów. Elipsydy przemieszczeń atomowych zostały przedstawione z 50% prawdopodobieństwem. Atomy wodoru (H) zostały przedstawione jako białe kule o dowolnym promieniu.

2-CM okazał się solwatem, w którym niezależna część komórki elementarnej zawierała dodatkowo jedną cząsteczkę wody. Wszystkie badane związki krystalizują jako β anomery, wyjątkiem jest 2-IG który w stanie krystalicznym tworzy α anomer.

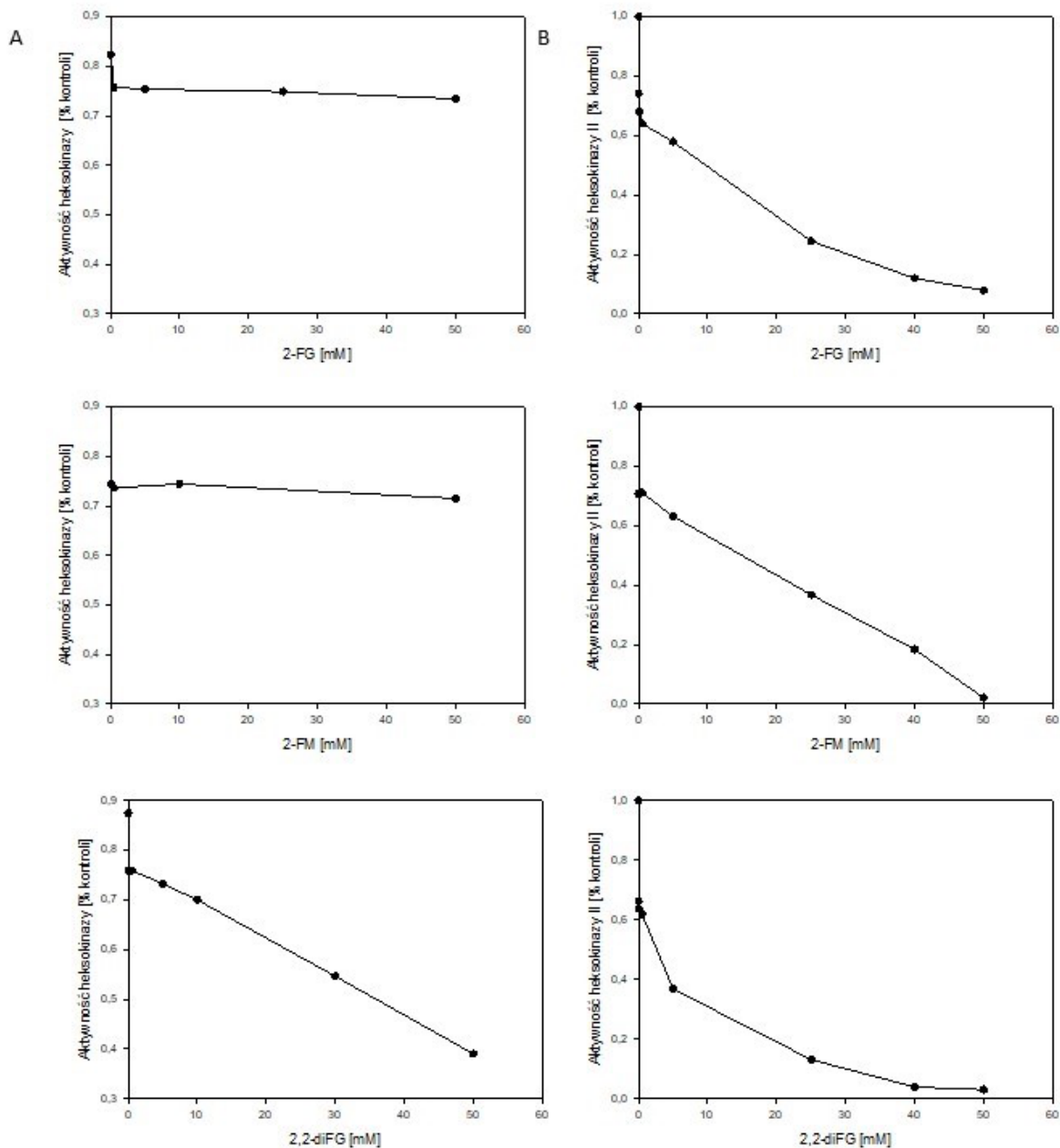
Mimo, że obecność atomu halogenu nie ma wpływu na samą strukturę pierścienia to substytucja w pozycji C2 ma istotny wpływ na strukturę krystaliczną badanych związków. Zmiany w strukturze krystalicznej są spowodowane głównie przez efekty steryczne - większy rozmiar atomu podstawnika prowadzi do powstania struktury warstwowej o wyższym stopniu upakowania. Pomimo efektywnego wypełnienia przestrzeni sieć wiązań wodorowych jest mniej gęsta w pochodnych chloro- i jodo- ze względu na rozmiary podstawnika.

W związku z tym, że fluor dobrze naśladuje zarówno wodór jak i grupę hydroksylową w wielu układach, krysztaly obu fluoropochodnych mają strukturę bardzo zbliżoną do anomeru β 2-DG. Ani upakowanie, ani wzór wiązania wodorowego nie ulegają znaczącym zmianom.

Uzyskane struktury krystaliczne zostaną wykorzystane do wykonania modelowania oddziaływania halogenopochodnych ze strukturami krystalicznymi HK II, zdeponowanymi w dostępnych bazach danych.

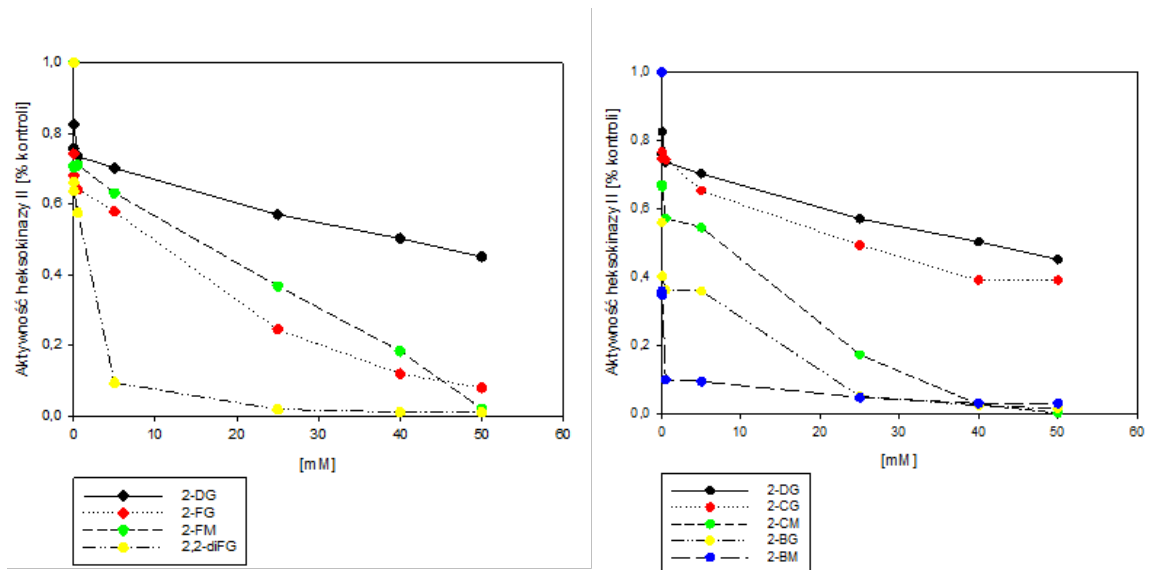
4.2.4. Hamowanie aktywności HK II przez halogenopochodne w układzie pozakomórkowym

Ze względu na brak możliwości uzyskania kryształów HK II, przeprowadzono analizę wpływu badanych pochodnych na aktywność HK II w układzie pozakomórkowym. W tym celu wykorzystano test zawierający rekombinowane białko HK II. W pierwszym etapie oceniono wpływ fluoro-pochodnych na aktywność heksokinazy bakteryjnej pochodzącej z *Bacillus Subtilis* (Rycina 33A) oraz ludzkiej HK II (Rycina 33B). Analizy wskazały selektywne hamowanie ludzkiej heksokinazy przez badane związki.



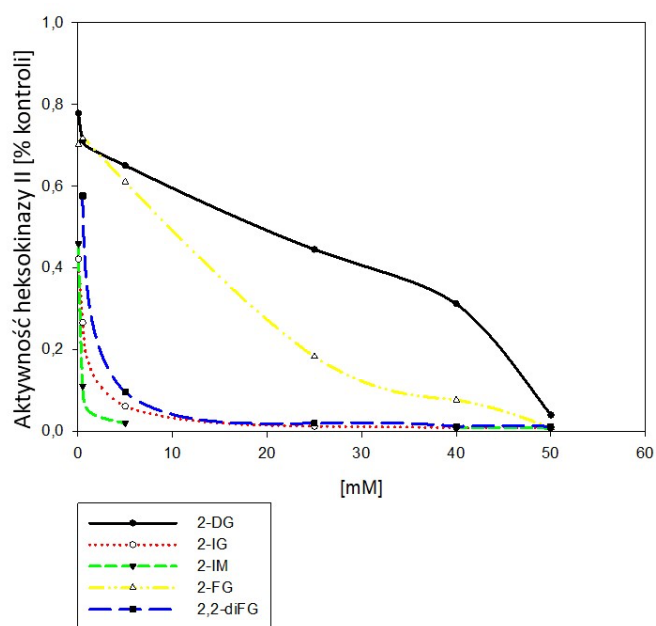
Rycina 33. Ocena wpływu fluoropochodnych 2-DG na aktywność A) heksokinazy bakteryjnej B) ludzkiej HK II w układzie pozakomórkowym oceniona testem Hexokinase Inhibitor Assay Kit firmy Abcam.

Następnie, wykonano analizy oddziaływania badanych halogenopochodnych 2-DG na aktywność ludzkiej HK II (Rycina 34).



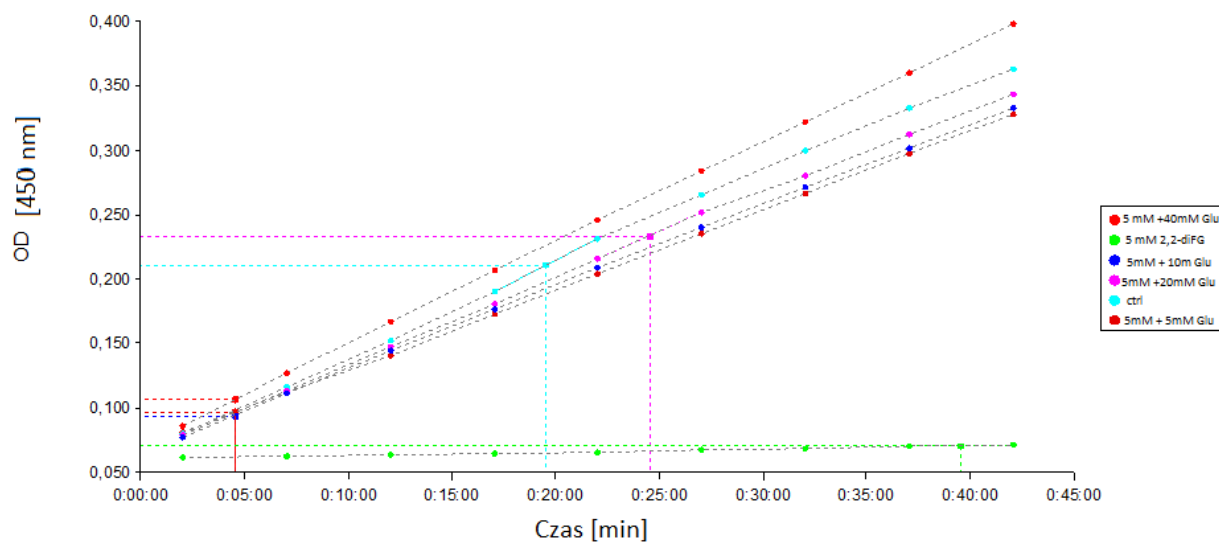
Rycina 34. Porównanie wpływu fluoro-, chloro- i bromo-pochodnych 2-DG na hamowanie aktywności ludzkiej HK II w układzie pozakomórkowym.

Jak ilustruje Rycina 34, każda z badanych halogenopochodnych wykazała właściwości supresyjne wobec aktywności HK II w układzie pozakomórkowym w stopniu silniejszym niż wyjściowa 2-DG. Najsilniejszą aktywność supresyjną wykazała 2,2-diFG (stężenie efektywne ok. 0,5 mM), podczas gdy najslabsze działanie obserwowano dla chloro-pochodnych. Wynik ten koresponduje z wynikami badań *in vitro*, w których 2,2-diFG wykazywała aktywność biologiczną w zbliżonym zakresie stężeń, podczas gdy chloro-pochodne nie były aktywne. Co ciekawe, analiza wykazała, iż bromo- i jodo-pochodne także silnie hamują aktywność HK II, co nie było obserwowane w układzie *in vitro* (Rycina 20). Wyjaśnienie tego zjawiska wymaga dalszych badań biochemicznych i fizykochemicznych, które zidentyfikowałyby inne oddziaływania, które warunkują brak efektów bromo- i jodo-pochodnych w badanych komórkach.



Rycina 35. Porównanie wpływu 2-DG, jodopochodnych 2-DG oraz 2,2-diFG na hamowanie aktywności ludzkiej HK II w układzie pozakomórkowym.

Ze względu na rozbieżności dotyczące wyników hamowania aktywności HK II testem Hexokinase Inhibitor Assay Kit (Abcam), a obserwowanych aktywności cytotoksycznych *in vitro*, wykonano dodatkową analizę potwierdzenia specyficzności wykorzystywanego testu. W tym celu do układu badawczego 2,2-diFG wprowadzono wzrastające stężenia glukozy [5, 10, 20, 40 mM], które kompetywnie znosiły hamujące działanie fluoro-pochodnej, podtrzymując aktywność HK II (Rycina 36).



Rycina 36. Analiza wpływu dodatku 5, 10, 20 i 40 mM glukozy na zdolność hamowania aktywności HK II przez 2,2-diFG [5 mM]. Absorbancja [OD] przy długości fali 450 nm jest wprost proporcjonalna do aktywności HK II w czasie. Jako kontrolę działania enzymu wykorzystano czysty bufor reakcyjny.

Jak wykazała przeprowadzona analiza, 5 mM 2,2-diFG blokuje aktywność HK II w czasie od 0 do 40 min (na wykresie zaznaczono kolorem zielonym). Wprowadzenie rosnących stężeń glukozy niwelowało hamujący wpływ 2,2-diFG na aktywność badanego enzymu. Wykazano, że już 5 mM glukozy wystarczy do osiągnięcia aktywności porównywalnej z próbą kontrolną.

Wynik eksperymentu potwierdził specyficzność i poprawność wykonanej analizy i pozwala na wnioskowanie o supresyjnych właściwościach badanych związków wobec aktywności ludzkiej HK II.

Przeprowadzone badania fizykochemiczne nie pozwoliły na jednoznaczne rozstrzygnięcie przyczyn zróżnicowanego oddziaływania biologicznego halogenopochodnych. Zdolność hamowania aktywności HK II jest jednym z mechanizmów ich działania, jednakże dalsze badania są konieczne, aby zidentyfikować inne parametry, modulujące aktywność biologiczną halogenopochodnych 2-DG.

5. Dyskusja

5.1. Specyfika metabolizmu komórek nowotworowych jako cel terapeutyczny

W ostatnich latach gwałtownie wzrasta poziom wiedzy na temat przebiegu kancerogenezy oraz znaczenia w tym procesie specyfiki metabolizmu komórek nowotworowych i jego odmienności od metabolizmu komórek prawidłowych. Zgromadzone w ostatnim czasie dowody wskazują, iż zmieniony metabolizm w komórkach nowotworowych jest nie tylko cechą charakterystyczną nowotworu, ale może być podstawową przyczyną rozwoju i progresji choroby nowotworowej [214]. Przełomowym odkryciem w zakresie opracowywania terapii ukierunkowanej na metabolizm nowotworu było zidentyfikowanie znaczenia 2-hydroksyglutaranu – onkometabolitu, występującego w wysokich stężeniach w komórkach glejaka [215]. Poprzez modyfikację wzorców metylacji histonów, 2-hydroksyglutaran zaburza ekspresję genów prowadząc do kancerogenezy [216]. Wśród ostatnio scharakteryzowanych onkometabolitów są także fumaran (w raku nerkowokomórkowym), sarkozyna (w raku prostaty) glicyna (w raku piersi), asparagina (w białaczce), cholina (w raku prostaty, mózgu i piersi), oraz mleczan, glukoza, glutamina i seryna [217]. Wzrost stężenia i akumulacja onkometabolitów wiąże się z podtrzymywaniem wysokiego tempa ich metabolizmu, w tym glikolizy, glutaminolizy czy metabolizmu kwasu foliowego [217]. Odkrycie onkometabolitów dostarcza dowodów na zaburzenia metabolizmu nowotworu wiążącego się z zaburzeniami produkcji energii. Przyspieszony metabolizm komórek nowotworowych generuje zwiększone zapotrzebowanie na substancje odżywcze w tym aminokwasy, czego konsekwencją jest wzrost zapotrzebowania na m.in. glutaminę, wykorzystywaną m.in. do ich syntezy, ale także biorącą udział w wytwarzaniu energii, przekazywaniu sygnałów komórkowych i biosyntezie nukleotydów. Komórki nowotworowe przeprogramowują metabolizm glutaminy z oksydacyjnego na redukcyjną karboksylację wytwarzając cytrynian w celu podtrzymania proliferacji [218]. Komórki nowotworowe metabolizują również inne substancje, takie jak kwasy tłuszczowe, octan, kwas 3-hydroksymasłowy, mleczan, pirogronian oraz glukozę w znacznie wyższym tempie niż komórki niezmiennione. Wykorzystanie różnic w metabolizmie komórek nowotworowych i prawidłowych jest obiecującą i coraz częściej stosowaną strategią terapeutyczną.

W ostatnich latach wiele leków ukierunkowanych na odmienny metabolizm komórek nowotworowych zostało zarejestrowanych przez FDA (*ang. Food and Drug Administration*, Agencja Żywności i Leków) do stosowania w klinice. Wśród nich znajdowały się: Pemetreksed - antagonist folianów, zaburzający procesy metaboliczne wykorzystujące kwas foliowy czy też 5-fluorouracyl lub Gemcytabina, analogi nukleotydów zaburzające syntezę DNA [219]. W

badaniach klinicznych I i II fazy w ostatnich latach analizowano także m.in. leki redukujące stężenie asparaginy (Elspar, Oncaspar, Erwinaze), czy związki ukierunkowane na zmieniony metabolizm glutaminy (Butionina, Imexan) [220]. Zatwierdzenie przez FDA terapii celowanej (Ivosidenib (AG-120), Enasidenib (AG-221)) w zmutowane IDH1/2 w ostrej białaczce szpikowej (*ang. acute myeloid leukemia.*, AML) stanowi przełom w precyzyjnym celowaniu w metabolizm nowotworu. IDH1/2 katalizują reakcję przekształcania izocytrynianu do α -ketoglutaranu i są kodowane przez najczęściej mutujące metaboliczne geny w ludzkich nowotworach [221-223]. Mutacje te skutkują utratą przez enzymy IDH1/2 aktywności katalitycznej w wyniku czego α -ketoglutaran ulega redukcji do 2-hydroksyketoglutaranu, który sprzyja procesowi kancerogenezy [224]. Częste mutacje IDH występują w nowotworach mózgu w związku z czym wiele inhibitorów II generacji przekraczających BBB jest w trakcie badań klinicznych, m.in. LY3410738 [225], DS.-1001b [226], Olutasidenib (FT-2102) [227], Vorasidenib (AG-881) [228], również w terapii glejaków [229]. W badaniach klinicznych jest także inhibitor glutaminazy CB-839 oraz cząsteczka CPI-613, inhibitor dehydrogenazy pirogronianowej (z *ang. pyruvate dehydrogenase*, PDH) i dehydrogenazy ketoglutaranowej, badane w kierunku terapii AML i raka trzustki [219].

Unikalną zaletą terapii celowanych w metabolizm komórek nowotworowych jest fakt, że mierzalne biomarkery występujące w osoczu są substratami lub produktami reakcji docelowych enzymów (leków), dzięki czemu szybko i łatwo można zweryfikować ich działanie [227]. Strategia terapeutyczna opierająca się na celowaniu w zmieniony metabolizm komórek nowotworowych obejmuje ukierunkowanie na trzy główne, niezbędnych do przeżycia komórki elementy: aminokwasy, kwasy tłuszczowe oraz glukozę [219].

5.2. Hamowanie procesu glikolizy w terapii nowotworów

Wykorzystanie zależności komórek nowotworowych od dostępności glukozy i procesu glikolizy, nawet w warunkach dostępności tlenu, oraz faktu, że w komórkach guza wychwyt glukozy jest 20-krotnie wyższy niż w komórkach prawidłowych jest strategią zyskującą coraz większe zainteresowanie. Obecnie rozwijanych jest kilka wysoce specyficznych inhibitorów metabolicznych allosterycznie oddziałujących na miejsca katalityczne enzymów. Kluczowym wyzwaniem związanym z inhibicją miejsc aktywnych enzymów jest przewaga kieszeni hydrofobowych w enzymach metabolicznych, przez co wyższą specyficzność wykazują tu inhibitory allosteryczne. Jednym z przykładów jest inhibitor miejsca aktywnego dehydrogenazy mleczanowej (LDH)(NCATS-SM1440/NCATS-SM1441) o nanomolowej skuteczności, potwierdzonej *in vivo* w mysich modelach nowotworów [230]. Hamowanie LDH

jest popularnym celem terapeutycznym. Wykazano m. in. iż nokaut LDH skutkuje zahamowaniem wzrostu nowotworu płuc [231] oraz ogranicza wzrost heteroprzeszczepu ludzkiego chłoniaka oraz raka trzustki w modelu mysim [71]. Poza enzymami zaangażowanymi w przekształcanie glukozy, celem terapeutycznym są również błonowe transportery glukozy. Przykładem leku ukierunkowanego na transporter GLUT1 jest cząsteczka STF-31, której skuteczność wykazano in vivo w heteroprzeszczepach raka nerkowokomórkowego (*ang. renal cell carcinoma*, RCC) [232]. Z kolei cząsteczka BAY-897 (inhibitor GLUT1) zaburzała wzrost heteroprzeszczepu potrójnie negatywnego raka piersi [233]. Silibinina i Cytochalazyna B wykazują właściwości supresyjne wobec GLUT1, indukując apoptozę w ludzkich liniach komórkowych raka piersi oraz raka płuc (*ang. non-small cell lung carcinoma*, NSCLC) [234, 235]. Kolejnym ważnym enzymem glikolitycznym którego obniżenie aktywności wyraźnie spowalnia proces glikolizy jest PKM2. Wykazano, że hamowanie PKM2 zatrzymuje rozwój heteroprzeszczepu niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC) in vivo [236]. W ostatnich latach były prowadzone także badania kliniczne I fazy pacjentów z GBM z wykorzystaniem innego inhibitora glikolizy, dichlorooctanu (*ang. dichloroacetate*, DCA) (NCT00540176) [237]. DCA jest inhibitorem mitochondrialnej PDK, który ogranicza natężenie glikolizy i wzmacnia oksydacyjną fosforylację, uwrażliwiając komórki na indukcję apoptozy. Co ważne, dotychczasowe badania kliniczne fazy I wykazały wysokie bezpieczeństwo DCA u ludzi [238].

5.3. Inhibitory heksokinazy jako kandydaci na leki w terapii przeciwnowotworowej

Jednym z głównych celów terapii ukierunkowanej na specyficzny dla komórek nowotworowych metabolizm glukozy jest heksokinaza II [239]. Nadekspresja HK II jest obserwowana w wielu typach komórek nowotworowych, w tym komórkach glejaka wielopostaciowego [82]. Liu i wsp. [75] wykazali istotny związek między wysoką ekspresją HK II, a krótszym całkowitym przeżyciem pacjentów z rakiem wątrobowokomórkowym, rakiem żołądka i rakiem jelita grubego, uznając HK II za niezależny czynnik prognostyczny pacjentów z guzami litymi [75]. HK II jest pierwszym enzymem w szlaku przemian heksoz, który katalizuje fosforylację glukozy do G-6-P a następnie jej wychwyty wewnątrzkomórkowy. Jak wykazały badania Patra i wsp. [2013], hamowanie aktywności HK II hamuje wzrost raka piersi i raka płuc in vivo [240].

Należy zauważyć, że enzymy glikolityczne wykazują stosunkowo wysokie stężenie wewnątrzkomórkowe wynoszące 0,27 μM dla HK II w porównaniu do 0,07 μM dla GLS1 (*ang. glutaminase I*, glutaminaza) w komórkach HeLa41 [241]. Wysokie stężenie enzymów wymaga zastosowania wysokich stężeń inhibitorów, aby zapewnić ich całkowitą neutralizację. Stwarza

to dodatkowe problemy z farmakokinetyką związków, dlatego ważne jest, aby postępowi badań klinicznych specyficznych inhibitorów enzymów i transporterów towarzyszyły rozbudowane badania biologiczne, biochemiczne a także strukturalne i fizykochemiczne.

Znanymi inhibitorami HK są m.in. 3-BrPA i lonidamina [239]. 3-BrPA wykazuje właściwości przeciwnowotworowe *in vitro* i *in vivo* w modelach raka wątrobowokomórkowego i raka płuc [242], jednakże w wysokich dawkach wykazuje rozległe skutki uboczne ograniczające jej kliniczne zastosowanie [243]. Z kolei skuteczność lonidaminy w badaniach przedklinicznych doprowadziła lek do badań klinicznych zarówno w monoterapii jak i w połączeniu z innymi chemioterapeutykami (Cisplatyna, Diazepam). Jednakże badania kliniczne II/III fazy z udziałem lonidaminy w terapii łagodnego guza gruczołu krokowego zostały zawieszono z powodu toksycznego oddziaływania leku na wątrobę [244]. Dzięki zastosowaniu nowoczesnych technik modelowania opartych o struktury krystaliczne HK II zdeponowane w bazach danych, opracowano również strukturę selektywnego inhibitora HK II - benitrobenrazydu (BNBZ), który wysoce efektywnie hamuje aktywność enzymu w modelu *in silico* (symulacje metodą mechaniki molekularnej i dynamiki molekularnej) [245]. Co ciekawe, niektóre bioaktywne związki pochodzenia naturalnego również wykazują właściwości supresyjne wobec HK II. Dai i wsp. [246] wykazali hamujący wpływ resweratrolu na aktywność HK II prowadząc do zahamowania glikolizy i indukcji apoptozy komórek raka wątrobowokomórkowego. Z kolei Tao i wsp. [247] wykazali supresyjne właściwości genisteiny wobec HK II w ludzkiej linii komórkowej raka piersi.

5.4. 2-DG w terapii przeciwnowotworowej

Najlepiej poznanym i najczęściej badanym inhibitorem glikolizy jest 2-DG. 2-DG konkuruje z glukozą o transportery glukozy (GLUT), co czyni 2-DG kompetycyjnym inhibitorem wychwytu glukozy. 2-DG jest allosterycznym inhibitorem niekompetycyjnym HK II oraz kompetycyjnym inhibitorem PGI [196]. Produkt przemian 2-DG, 2-DG-6-P, nie ulega dalszemu metabolizmowi ze względu na brak grupy hydroksylowej i akumuluje się w komórkach prowadząc do niedoboru ATP i w efekcie do śmierci komórki. Ostatnie badania wskazują jednak, iż nagromadzenie 2-DG-6-P prowadzi także do aktywacji fosfataz Dog1 i Dog2 (*ang. 2-deoxyglucose-6-phosphate phosphatase*, fosfataza 2-DG-6-P), enzymów mających zdolność rozkładania 2-DG-6-P. Identyfikacja Dog1 i Dog2 była opisana w modelu drożdży, wskazuje jednak na możliwy mechanizm oporności komórek na 2-DG [248]. Dane literaturowe wskazują bowiem przypadki linii komórkowych opornych na działanie 2-DG, np. HepG2 (linia komórkowa raka wątroby) oraz HT29D4 (linia komórkowa gruczolaka jelita

grubego) [249]. W ostatnim czasie zidentyfikowano również mutację w genie *Saccharomyces cerevisiae* kodującym HK II, Hxk2^{G238V}, powodującą utratę funkcji tego genu i skutkującą brakiem możliwości wiązania 2-DG [250]. Badania te podkreślają istotną rolę nawet minimalnych zmian konformacyjnych dla zdolności HK II katalizowania procesu glikolizy.

Istnieje wiele doniesień literaturowych potwierdzających efektywność 2-DG w hamowaniu procesu glikolizy w grzybach [251], wirusach [252-254] oraz komórkach nowotworowych [249]. Wykorzystanie 2-DG w terapii raka po raz pierwszy zostało opisane w literaturze przez Jain i wsp. [255]. Od tego czasu, 2-DG była intensywnie badana a jej właściwości cytotoksyczne opisano w literaturze w różnych modelach komórek nowotworowych [41], w tym w modelu GBM [6,170,256].

Ze względu na swoje wysokie podobieństwo strukturalne do cząsteczki glukozy, 2-DG przekracza BBB i wnika do komórek za pomocą transporterów glukozy, dzięki czemu może być skutecznie podawana pacjentom z nowotworami mózgu [100]. Według Kim i wsp. [170], 2-DG hamuje żywotność oraz proliferację komórek GBM w stężeniach, które są zbieżne ze stężeniami wyznaczonymi jako efektywne w niniejszej pracy. Z kolei Priebe i wsp. [256] analizując wpływ inkubacji z 2-DG na żywotność panelu linii GBM w warunkach normoksji i hipoksji wykazali, że zarówno w obecności tlenu jak przy jego niedoborze, 2-DG hamowała wzrost komórek GBM w stężeniu 2-6 mM. Analogiczne obserwacje uzyskano w niniejszej pracy doktorskiej (wartość IC₅₀ wynosiła około 5 mM). Wyniki te wskazują, iż komórki glejaka charakteryzuje wysoce glikolityczny metabolizm nawet w warunkach normoksji, co koreluje z agresywnym wzrostem nowotworu i wysoką opornością na stosowane terapie.

Poza efektywnym cytotoksycznym oddziaływaniem monoterapii 2-DG, liczne badania opisują pozytywne efekty 2-DG jako czynnika uwrażliwiającego komórki, m.in. GBM na działanie innych leków. Podstawą stosowania terapii skojarzonej 2-DG ze standardową chemioterapią jest fakt, iż standardowa chemioterapia ogranicza się do szybko dzielących się komórek (zarówno nowotworowych jak i prawidłowych), podczas gdy wolno-dzielące się komórki pozostają niewrażliwe. Wolno-dzielące się komórki nowotworowe są często zlokalizowane w hipoksyjnym środowisku guza. Dlatego, liczni badacze postulują, iż inhibitory glikolizy, w tym 2-DG, mogą potencjalnie zwiększać cytostatyczne i cytotoksyczne efekty działania leków wobec komórek w stanie niedotlenienia, o spotęgowanym metabolizmie glikolitycznym [257-259]. Przykładem są badania Sun i wsp. [260], którzy wykazali, iż 2-DG uwrażliwia komórki GBM na cytotoksyczne oddziaływanie BCNU (*ang. 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea*, 3-(3,4-dichlorofenylo)-1,1-dimetylomocznik) poprzez hamowanie glikolizy oraz wzrost produkcji ROS i indukcję stresu ER. Ponadto, Mohanti i wsp. [261]

wykazali, że 2-DG uwrażliwia komórki glejaka na radioterapię. Analogiczne badania kliniczne były kontynuowane przez inne zespoły a pacjentom z glejakiem podawano 200-300 mg/kg mc. 2-DG, 30 min przed napromieniowaniem i wykazano doskonałą zgodność, tolerancję i bezpieczeństwo skojarzonego leczenia a dowody kliniczno-patologiczne potwierdziły ochronę prawidłowej tkanki mózgowej [191,262]. Co ciekawe, dopiero w 2019 roku został potwierdzony mechanizm działania 2-DG odpowiedzialny za przełamywanie oporności na radioterapię. Shah i wsp. [6] badając wpływ wysokich dawek radioterapii na pochodzące od pacjentów linii GBM wykazał wzrost poziomu autofagosomów, stresu ER i aktywację odpowiedzi niepołałdowanych białek (UPR), które były negatywnie skorelowane z przeżywalnością pacjentów.

5.5. Nowe pochodne 2-DG jako inhibitory heksokinazy

Do dziś 2-DG testowano w wielu modelach nowotworowych, również w badaniach klinicznych. Terapeutyczne zastosowanie 2-DG nie zostało jednak finalnie wdrożone. Jak opisano we Wstępie niniejszej pracy, główną przeszkodą są niewystarczające właściwości farmakokinetyczne cząsteczki, jej krótki okres półtrwania i konieczność konkurencji z fizjologicznie wysokim stężeniem glukozy we krwi. W odpowiedzi na opisane problemy zaistniała konieczność poszukiwania analogów 2-DG, które wykazywałyby podobne właściwości biologiczne, ale charakteryzowałyby się lepszą farmakokinetyką. Konsekwencją prac badawczych w tym kierunku była synteza 2-FG a następnie innych pochodnych w których 2 węgiel 2-DG jest podstawiony atomem halogenu: fluoru, chloru, bromu oraz jodu. Ponadto, podjęto próby syntezy różnych acetylowanych pochodnych 2-DG, z czego najbardziej obiecującym analogiem okazała się cząsteczka 3,6-di-O-acetylo-2-deoksy-D-glukoza (WP1122). Należy podkreślić, iż syntezy te są procesami złożonymi i jak wynika z literatury, otrzymane w laboratorium Profesora Priebe halo-pochodne (bromo-, chloro, jodo) 2-DG są unikalne i istnieją nieliczne opublikowane dane opisujące ich właściwości biologiczne.

2-FG jest najlepiej poznaną pochodną 2-DG ze względu na swoje szerokie zastosowanie w diagnostyce. 2-FG została zsyntetyzowana w latach 70 XX w., co pozwoliło na prowadzenie badań dotyczących akumulacji produktów przemian 2-FG w komórkach i ich wpływu na glikolizę [263]. Z kolei w latach 80 uzyskano 2-[¹⁸F]-DG do badań nad metabolizmem glukozy w ludzkim mózgu [264]. Som i wsp. [264] wykazali, że 2-FG jest w wysokim stopniu wchłaniana przez szybko rozwijające się nowotwory i dzięki tej właściwości do dziś jest wykorzystywana w diagnostyce guzów. Od tego czasu właściwości 2-[¹⁸F]-DG zostały szeroko opisane w literaturze [265,266] Nieliczne doniesienia odwołują się jednakże do efektów

cytotoksycznych tego związku wobec komórek nowotworowych. Lampidis i wsp. [267] wykazali wyższą cytotoksyczność 2-FG w porównaniu do 2-DG wobec komórek kostniakomięsaka linii 143B. Uzyskane w pracy doktorskiej wyniki są zgodne z przytoczonymi obserwacjami i wykazały również wyższą aktywność cytotoksyczną 2-FG w obu badanych liniach komórkowych GBM. Zespół Lampidis i wsp. [267] wykonał także zgrubne analizy oddziaływania 2-CG i 2-BG, ale nie 2-IG wobec komórek kostniakomięsaka. Analogicznie do wyników uzyskanych w niniejszej pracy doktorskiej, działanie 2-CG oraz 2-BG było istotnie mniej efektywne niż 2-DG. Rozważając przyczyny uzyskanych wyników, Lampidis i wsp. [267] poddali analizie *in silico* z wykorzystaniem modelowania, fizykochemiczne parametry atomów halogenków. Porównując 2-FG i 2-DG stwierdzili, że nie ma istotnej różnicy między wielkością molekuł fluoru i wodoru. Jednakże oddziaływania elektronowe fluoru są bardziej zbliżone do oddziaływań grupy hydroksylowej w pozycji C2 glukozy niż wodoru w 2-DG. Rozważania te nasuwają pytanie czy to powyższe właściwości determinują wyższą cytotoksyczność 2-fluoro pochodnych glukozy [267].

Co ważne, przeprowadzone analizy halogenowych pochodnych mannozy nie były dotychczas opisywane w literaturze. Ich celem było określenie znaczenia orientacji podstawnika wobec efektów biologicznych cząsteczek. Jak wskazują otrzymane wyniki, jedynie w przypadku jodopochodnych aktywność cytotoksyczna pochodnej mannozowej znacznie różniła się od pochodnej glukozowej. Co więcej aktywność 2-IM była wyższa od aktywności 2-IG (Tabela 2, Ryc.12, 16, 17). W przypadku pozostałych pochodnych (F, Cl, Br) oddziaływania analogów mannozowych nie wykazywały znaczących różnic względem analogów glukozowych, należy zatem stwierdzić, że w ich przypadku orientacja podstawnika nie ma wpływu na efekty biologiczne cząsteczek.

Lampidis i wsp. [267] porównali również potencjał cytotoksyczny fluoro, chloro i bromo-pochodnych w warunkach normoksji i hipoksji. Wykazali wówczas, że komórki kostniakomięsaka w stanie hipoksji były istotnie wrażliwsze na działanie 2-FG niż komórki w warunkach normoksji. Ponadto zaobserwowali również, że istnieje selektywność między komórkami znajdującymi się w środowisku normoksji i hipoksji, która jest odwrotnie proporcjonalna do rozmiaru halogenku zastępującego wodór przy węglu C2 w 2-DG [267]. Wykazano, iż wraz ze wzrostem wielkości halogenku zmniejsza się zdolność pochodnych glukozy do wiązania się z HK I, którą można opisać jako $2\text{-FG} < 2\text{-CG} < 2\text{-BG}$.

Przeprowadzone w niniejszej pracy badania były jednak ukierunkowane na weryfikację możliwości hamowania aktywności HK II, której nadekspresja jest charakterystyczna dla komórek GBM, a nie HK I. Ponadto, wśród badanych pochodnych analizowano także jodo-

pochodną, która nie była testowana we wcześniejszych badaniach. Jak wskazują otrzymane wyniki, podobnie do badań na modelu komórkowym kostaniakomiesaka, również w komórkach GBM oddziaływanie bromo- i chloro-pochodnych 2-DG jest istotnie słabsze niż 2-DG. Z kolei 2-IG oraz 2-IM wykazały wyższą aktywność supresyjną wobec HK II *in vitro* i co ciekawe najsilniej hamowały aktywność HK II w układzie pozakomórkowym. Zdolność hamowania aktywności HK II przez badane pochodne można opisać jako 2-IG < 2-CG < 2-BG, oraz 2-FM < 2-IM < 2-BM < 2-CM. Dodatkowo, w niniejszej pracy zweryfikowano oddziaływanie 2,2-diFG, która *in vitro* hamowała HK II w stopniu podobnym do 2-DG, natomiast wykazywała najsilniejsze właściwości supresyjne wobec enzymu, tuż obok 2-IM, w badaniach biochemicznych w systemie pozakomórkowym.

Zarówno w badaniach komórkowych jak i pozakomórkowych z udziałem pochodnych 2-DG oraz rekombinowanej HK II zachodzi wiele czynników ingerujących w te oddziaływania i modyfikujących wyniki względem modelowania molekularnego przeprowadzonego *in silico* w neutralnym środowisku pozbawionym wpływu innych enzymów i procesów komórkowych. W ramach pracy doktorskiej zaplanowano zatem dodatkową analizę z wykorzystaniem krystalografii rentgenowskiej, aby ocenić oddziaływania pomiędzy badanymi pochodnymi a strukturą centrum aktywnego HK II. W tym celu wykonano produkcję ludzkiego rekombinowanego białka HK II w systemie bakteryjnym, jednakże dotychczas nie udało się uzyskać kryształów spełniających wymagania konieczne do przeprowadzenia analiz krystalograficznych. W ramach realizowanego projektu OPUS trwają zatem alternatywne prace nad dokowaniem oddziałujących halogeno-pochodnych 2-DG do centrum aktywnego HK II z wykorzystaniem metod modelowania molekularnego.

5.6. Aktywność biologiczna nowych pochodnych 2-DG

W prezentowanych badaniach *in vitro* wykazano, że wszystkie wyżej wymienione halogenopochodne 2-DG wywołały w komórkach GBM linii U-87 i U-251 skutki cytotoksyczne objawiające się m.in. obniżoną proliferacją i przeżywalnością komórek (Ryc. 11, Ryc.14-15). Jednakże w badaniach Lampidisa i wsp. [267] oraz badaniach przeprowadzonych w niniejszej pracy wykazano, iż najbardziej efektywnymi inhibitorami HK oraz czynnikami cytotoksycznymi są fluoro-pochodne. Jak wspomniano powyżej, wielkość atomu fluoru oraz jego efekty elektronowe powodują, że 2-FG pod względem fizykochemicznym jest analogiem najbardziej zbliżonym do glukozy zatem najlepiej wpasowuje się do centrum aktywnego HK II. Co więcej, ufosforylowana forma 2-FG, 2-FG-6-P, ze względu na swoje podobieństwo do G-6-P również może blokować HK II na podobnym

poziomie [102]. Dzięki tym właściwościom, 2-FG jest bardziej aktywny i efektywniejszy w blokowaniu glikolizy niż 2-DG [102] co zostało potwierdzone również w niniejszej pracy doktorskiej (Ryc. 18). Atom fluoru, jako najwyżej położony wśród halogenków, jest najmniejszy i najbardziej reaktywny. Zgodnie ze wzrostem liczby atomowej pierwiastków ($F < Cl < Br < I$) rośnie promień atomu oraz liczba wypełnionych powłok elektronowych, czego konsekwencją jest spadek reaktywności. Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej potwierdzają tę zależność dla wszystkich związków z wyjątkiem 2-IM. Ponadto, fluor jako najbardziej elektroujemny pierwiastek w układzie okresowym (elektroujemność F wg. Paulinga = 4.0) odgrywa ważną rolę w modulacji pKa sąsiednich podstawników [268]. Dla przykładu fluorowanie serii leków przeciwpsychotycznych, pochodnych 3-piperidynylindolu, zmniejszyło zasadowość sąsiadującej grupy aminowej poprawiając w ten sposób ich biodostępność i powinowactwo do receptora serotoninowego 5-HT_{2A}. Dodatkowe fluorowanie w pozycji 6 indolu zapewniło jego wyższą stabilność metaboliczną [269]. Rozważając efekty konformacyjne, addycja pojedynczego fluoru wykazuje nieznaczny wpływ na efekty steryczne, nie zmieniając konformacji wiązania z miejscem aktywnym receptora co jest wyjaśnione przez wysokie podobieństwo oddziaływań van der Waalsa między atomami fluoru (1.20 Å) oraz wodoru (1.47 Å). Rozważania te są zgodne z przedstawionymi przez zespół Lampidisa i wsp. [267] jeśli chodzi o podobieństwo 2-FG do 2-DG. Z kolei wpływ atomu fluoru na biodostępność, stabilność oraz zwiększenie powinowactwa do receptora może również być powodem wyższej aktywności cytotoksycznej fluoropochodnych 2-DG, w tym 2-FM oraz 2,2-diFG. Antonovic i wsp. [270] wykazali, że 2-FM hamuje glikolizę prowadząc do śmierci komórek GBM linii U-87 w stężeniu ok 3 mM zarówno w warunkach normoksji jak i hipoksji, co jest zgodne z prezentowanymi w niniejszej pracy wynikami badań (Tabela 1). Ponadto, wyniki uzyskane przez Priebe i wsp. [271] wskazują, iż 2-FM wykazuje wyższą aktywność cytotoksyczną niż 2-DG w komórkach raka trzustki linii Colo357 a także dużo wyższą aktywność niż 2-CM i 2-BM w komórkach GBM linii U-251. Dodatkowo, Zespół wykazał wyższą aktywność 2-FM w warunkach normoksji niż hipoksji na linii U-87, podczas gdy w zawartych w niniejszej pracy wynikach nie wykazano znaczących różnic (Ryc. 14). Postuluje się, iż 2-FM jako analog mannozy zaburza proces N-glikozylicacji białek i indukcji UPR, prowadząc do autofagii i eliminacji komórek nowotworowych znajdujących się również w stanie normoksji [271].

W ostatnich latach wykorzystywanie halogenków w chemii medycznej stało się bardzo popularne. W 2020 roku FDA zatwierdziło do stosowania w klinice 13 leków zawierających fluor [272]. Natomiast w roku 2021 zatwierdzono 14 związków zawierających w swoich

strukturach halogenki, z czego 8 z nich zawierało fluor, 4 związki posiadały podstawnik chlorowy a 2 zawierały kombinację powyższych [273]. 6 z zaaprobowanych leków dotyczyło terapii przeciwnowotworowych [274]. Fluorowce jako pierwiastki grupy 17 układu okresowego charakteryzują się wysoką elektroujemnością, a co za tym idzie reaktywnością chemiczną. Z kolei do roku 2019 na rynku znajdowało się ponad 250 leków zawierających w swojej strukturze chlor, podkreślając jego rolę w poszukiwaniu nowych substancji leczniczych [275]. Atom chloru ma większe rozmiary niż atom fluoru, tworzy stabilniejsze wiązanie z węglem oraz jest lepszym akceptorem wiązań halogenowych w porównaniu z fluorem [276]. Jednakże ze względu na opisane wcześniej efekty steryczne związane z wielkością atomu aktywność cytotoksyczna 2-CG wobec komórek GBM okazała się nieco niższa niż 2-DG, podobne wyniki uzyskano dla 2-BG.

Mechanizm oddziaływania jodopochodnych wciąż nie został dokładnie poznany. Ze względu na trudności w otrzymaniu stabilnych 2-IG oraz 2-IM w literaturze brak jest danych dotyczących tych związków a przeprowadzone w niniejszej pracy badania są pierwszymi w zakresie ich aktywności biologicznej. Jod jest pierwiastkiem niezbędnym do życia a jego niedobór jest czynnikiem ryzyka wielu nowotworów w tym żołądka i piersi [277]. W większości tkanek jod pełni funkcje przeciwutleniające, przeciwzapalne, antyproliferacyjne, przeciwbakteryjne i proapoptotyczne [278]. Może działać bezpośrednio jako donor elektronów wychytując wolne rodniki np. hydroksylowe. Może również wywoływać efekty pośrednie poprzez jodowanie aminokwasów (tyrozyny i histydyny) lub kwasów tłuszczowych, zmniejszając prawdopodobieństwo ich utlenienia. Uważa się również, że jod oddziałuje z tiolowymi układami redoks takimi jak glutation i tioredoksyna, w celu utrzymania równowagi redoks w komórkach [278]. Zgodnie z teorią Lampidisa i wsp. [267] dotyczącą znaczenia wielkości atomu halogenku dla zdolności hamowania glikolizy, jodopochodne powinny wykazywać najniższą aktywność ze względu na największy atom przyłączony do pierścienia. Jest to zgodne z wynikami analizy cytotoksyczności 2-IG (IC_{50} powyżej 20 mM), której stężenie efektywne jest dużo wyższe niż stężenie wyjściowej 2-DG. Tak jak opisano powyżej, 2-CG oraz 2-Br także nie odbiegają od tego schematu.

Jednak 2-IM wykazuje dużo wyższą aktywność względem obu linii komórkowych, porównywalną z 2-DG i fluoropochodnymi. Atom jodu charakteryzuje się znacznie większym rozmiarem od atomu fluoru i zgodnie z wynikami uzyskanymi metodą modelowania molekularnego związek ten nie powinien wpasowywać się w miejsce aktywne HK I. Również zgodnie z układem okresowym pierwiastków, reaktywność fluorowców spada wraz ze wzrostem masy atomowej. Z drugiej strony, badania hamowania heksokinazy II w układzie

pozakomórkowym wykazały najwyższą inhibicję tego enzymu właśnie przez jodopochodne (Ryc. 35). Możliwe jest również indukowanie innego mechanizmu prowadzącego do śmierci komórkowej przez 2-IM, takie jak reakcja rodnikowa lub substytucja nukleofilowa prowadząca do formowania się wiązań kowalencyjnych z białkami [279, 280]. Dodatkowo, jod posiada silny charakter elektrofilowy dostarczając czynników alkilujących do biomolekularnych reakcji SN_2 z molekułami takimi jak cysteina [280]. Biorąc pod uwagę opisane powyżej właściwości jodu, wydaje się możliwe, że w komórkach dochodzi do rozpadu 2-IM a wzmożona aktywność tego związku może wynikać z oddziaływań molekularnego jodu. W celu wyjaśnienia wzmożonej aktywności cytotoksycznej 2-IM konieczne jest przeprowadzenie dodatkowych analiz.

Ciekawe obserwacje uzyskano w niniejszej pracy w kontekście badania acetylowanej pochodnej 2-DG. Wykazano, że związkiem o najsilniejszej aktywności cytotoksycznej wobec badanych komórek GBM linii U-87 i U-251 jest acetylowana pochodna 2-DG - WP1122 (Ryc. 11). W badanych liniach komórkowych GBM, stężenie efektywne WP1122 jest prawie 10-krotnie niższe niż stężenie 2-DG (5 mM na obu liniach). Uzyskane stężenia efektywne związku korespondują ze stężeniami opisanymi w literaturze [281]. Priebe i wsp. [281] w badaniach *in vivo* prowadzonych w ortotopowym modelu mysim GBM wykazali, że WP1122 dużo efektywniej przekracza BBB niż 2-DG. Dzięki obecności w strukturze reszt acetylowych, także wnikanie WP1122 do wnętrza komórek jest bardziej wydajne na drodze dyfuzji biernej. Wewnątrz komórek WP1122 ulega deacetylacji pod wpływem esteraz, uwalniając aktywną cząsteczkę 2-DG [281]. Należy zauważyć, iż stężenie efektywne WP1122 w modelach *in vivo* może być nawet niższe niż w układach *in vitro*. Analizy cytotoksyczności (żywołność, proliferacja, apoptoza) były bowiem prowadzone w środowisku hodowlanym, w którym obecna była glukoza w stężeniu 1 mg/ml. Jest to stężenie, które pozwala komórkom na przeżycie i proliferację w hodowli a zatem transport badanych związków do komórek a następnie ich fosforylacja przez HK II odbywały się na zasadzie konkurencji z cząsteczkami glukozy. Takie warunki miały wpływ na ich stężenia efektywne a wyeliminowanie glukozy z pożywki komórek nie było możliwe.

5.7. Znaczenie heterogenności nowotworu dla odpowiedzi na terapię

Ciekawą obserwacją wynikającą z przeprowadzonych badań jest zróżnicowana wrażliwość linii U-87 i U-251 na działanie badanych czynników. Jak wskazują dane literaturowe, linie komórkowe U-87 i U-251, mimo iż reprezentują ten sam typ nowotworu to różnią się między sobą nie tylko pod względem morfologicznym, ale także genetycznym [282].

W konsekwencji ich reakcja na te same stężenia badanych związków może być różna, co ilustrują badania żywotności komórek w odpowiedzi na działanie 2,2-diFG ($IC_{50} = 0,5$ mM na linii U-251 i $IC_{50} = 5$ mM na linii U-87). Podobne wyniki uzyskał Zakaria i wsp. [283] badając wpływ TMZ i brinamantu na odpowiedź komórkową linii pobranych od pacjentów oraz komercyjnie dostępnych linii komórkowych, m.in. U-87 i U-251. Zakari i wsp. [283] wykazali zróżnicowaną odpowiedź komórek na poszczególne traktowania, sugerując, że ich wrażliwość na terapię *in vivo* może być mocno zależna od mikrośrodowiska guza. Należy zauważyć, iż prowadzone w niniejszej pracy eksperymenty prowadzone były w warunkach dostępności tlenu, a zatem niezupełnie odpowiadających środowisku guza nowotworowego w organizmie, które jak wspomniano we Wstępie, charakteryzuje niedobór tlenu i substancji odżywczych. Celowo jednak jako model badawczy wybrano wysoce glikolityczne linie komórkowe, aby możliwie zmniejszyć te różnice. Przeprowadzono również analogiczne badania żywotności w środowisku naśladującym hipoksję i porównano wyniki obu analiz (Ryc. 14). Li i wsp. [284] dowiedli, że komórki GBM linii U-251 charakteryzuje bardziej glikolityczny metabolizm, przez co są one bardziej odporne na warunki hipoksji oraz mocniej zależne od dostępu glukozy. Wnioski Li i wsp. [284] są zbieżne z uzyskanymi w niniejszej pracy wartościami IC_{50} badanych związków, które w przypadku większości badanych analogów (WP1122, 2-FG, 2-FM, 2,2-diFG, 2-IG, 2-CG) miały niższą wartość w modelu linii U-251. Większa zależność od glukozy komórek linii U-251 koresponduje z ich zwiększoną podatnością na działanie inhibitorów glikolizy, zatem niższe stężenia związków pozwalają uzyskać zamierzony efekt. Jest to najlepiej widoczne w przypadku wpływu związków WP1122 oraz 2,2-diFG (Ryc. 12).

Obserwacja ta wskazuje na istotny problem jakim jest heterogenność nowotworów nawet w obrębie danego typu nowotworu. Tłumaczy to różną odpowiedź pacjentów na te same schematy leczenia oraz dodatkowo uwidacznia potrzebę indywidualnej diagnostyki danego nowotworu oraz konieczność indywidualizowania terapii w kontekście zidentyfikowanego podłoża zmian w komórkach guza. W świetle dużej zmienności genetycznej nowotworów, ukierunkowanie terapii na uniwersalny i podstawowy szlak komórkowy warunkujący przeżycie komórek jakim jest utylizacja glukozy i synteza ATP, stwarza największą szansę na eliminację komórek GBM.

5.8. Znaczenie autofagii w odpowiedzi komórek GBM na działanie inhibitorów glikolizy

Powszechnie wiadomo, iż autofagia może wpływać zarówno na hamowanie wzrostu komórek nowotworowych jak i pełnić funkcję ochronną przed skutkami działania chemoterapeutyków i progresją choroby. Udowodniono, że w niektórych typach nowotworów,

np. trzustki, proces autofagii ulega nasileniu co skutkuje zwiększoną przeżywalnością i przyspieszonym wzrostem komórek [285].

W niniejszej pracy założono, że zahamowanie glikolizy przez badane pochodne 2-DG oraz zmniejszona dostępność glukozy w środowisku powinna aktywować mechanizm autofagii w celu uzyskania alternatywnej energii. W badaniach nad tym procesem kluczowym zagadnieniem jest ustalenie czy autofagia nasila się czy ulega hamowaniu pod wpływem inkubacji z badanymi czynnikami. W obu przypadkach, w komórkach dochodzi do podwyższenia liczby autofagolizosomów a zatem w celu rozstrzygnięcia znaczenia autofagii wykonano analizę tzw. „przepływu autofagalnego” (z ang. *autophagy flux*) określając względny poziom przekształcania cytozolowego białka MAP LC3-I w jego formę związaną z błoną autofagosomów - MAP LC3-II. Xi i wsp. [2011] wykazali, że w liniach komórkowych raka trzustki CRL-1420, raka skóry MDA-MB-435 oraz raka piersi SKBR3 w odpowiedzi na inkubację z 4-10 mM 2-DG oprócz obniżenia poziomu ATP, dochodzi do stresu ER oraz aktywacji procesu autofagii. Dodatkowo zaobserwowano, że wprowadzenie do środowiska mannozy hamuje aktywowaną stresem ER autofagię, nie mając przy tym wpływu na poziom ATP [126]. Naukowcy wykazali również, że w warunkach hipoksji, udział autofagii jest zmniejszony, co korelowało z niższym poziomem markera stresu ER Grp78 [126]. Ponadto, zablokowanie możliwości aktywacji autofagii z wykorzystaniem siRNA zwiększało wrażliwość badanych komórek na 2-DG. Badania te dowodzą, że w modelu raka trzustki autofagia pełniła funkcję protekcyjną wobec indukowanej przez 2-DG śmierci komórkowej, na drodze stresu ER [126].

W niniejszej pracy również zaobserwowano podwyższoną liczbę autofagolizosomów w komórkach traktowanych badanymi związkami (Ryc. 23, 24). Uzyskane w pracy wyniki sugerują, że hamowanie glikolizy uaktywnia proces autofagii, jednak szczegółowe analizy wykazały, iż brak syntezy ATP i inne skutki komórkowe indukują śmierć komórkową niezależną od autofagii. Badanie żywotności komórek GBM inkubowanych jednocześnie z badanymi związkami i chlorochiną (CQ), inhibitorem procesu autofagii, nie wpłynęło istotnie na efekty cytotoksyczne i zmniejszenie żywotności indukowane przez większość badanych pochodnych 2-DG (Ryc. 20). Ponadto, w komórkach traktowanych pochodnymi 2-DG poziom białka MAP-LC3 był zbliżony do komórek kontrolnych. Jedynie w przypadku oddziaływania 2-FG, 2-FM oraz 2-DG można zauważyć, że zahamowanie autofagii przez CQ, spowodowało wzrost przeżywalności komórek, sugerując, że w przypadku tych związków autofagia ma udział w indukcji śmierci komórkowej. Należy jednak podkreślić, iż zmiany żywotności nie przekraczały 10 %. Podobne obserwacje zostały opisane przez Priebie i wsp. [256] oraz

Antonovica i wsp. [270]. Priebe i wsp. [256] w swoich badaniach stwierdził indukcję procesu autofagii w odpowiedzi na inkubację panelu linii komórkowych z 2-DG. Z kolei zespół Antonowica [270] zaobserwował indukcję autofagii w komórkach linii U-87 traktowanych 2-FM w warunkach normoksji, która została zobrazowana z wykorzystaniem TEM. W prowadzonych w niniejszej pracy badaniach, inkubacja komórek GBM linii U-87 i U-251 z badanymi analogami 2-DG, wykazała obecność typowych dla procesu autofagii struktur - wakuoli autofagowych (Ryc. 23, 24), które zostały zidentyfikowane z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej oraz metody Western blot. Co ciekawe, analiza ultrastruktury komórek uwidoczniała także zaburzenia morfologii mitochondriów pod wpływem działania inhibitorów glikolizy, jakie jak fuzja, utrata grzebieni mitochondrialnych i ich obkurczenie (Ryc. 24). Niektóre doniesienia literaturowe wskazują, iż fuzja mitochondriów jest mechanizmem obronnym przed apoptozą [286]. Z kolei Shiratori i wsp. [287] wykazali, że zahamowanie glikolizy w komórkach raka trzustki PANC-1 radykalnie zmienił morfologię mitochondriów: obserwowano ich podłużny kształt, a także fuzję i obkurczenie. W ramach niniejszej pracy nie prowadzono szczegółowych analiz mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za obserwowane zmiany morfologii i być może aktywności mitochondriów. Obserwacje te wskazują jednak na konieczność wykonania dalszych analiz w tym zakresie, które mogą także ujawnić inne mechanizmy oddziaływania badanych pochodnych 2-DG, które mogą determinować obserwowane efekty cytotoksyczne.

5.9. Podsumowanie

Przedłużająca się (72 h) ekspozycja komórek linii U-87 oraz U-251 na badane pochodne 2-DG, niedobór glukozy i ATP a także inne wewnątrzkomórkowe efekty tych związków, które nie były obiektem badań w tej pracy (np. stres ER, wpływ ROS czy zaburzenia N-glikozylacji białek) doprowadziły do aktywacji mechanizmów prowadzących do apoptotycznej śmierci komórek (Ryc. 17). Spośród badanych pochodnych fluoro- i acetylo-pochodne 2-DG są najbardziej obiecującymi kandydatami do dalszego rozwoju w terapii GBM. Ich podobieństwo do struktury glukozy warunkujące możliwość przenikania bariery krew-mózg, stanowi istotną przewagę nad innymi chemioterapeutykami. Pomimo, iż koncepcja hamowania metabolizmu glukozy wydaje się być nie nową ideą w rozwoju terapii przeciwnowotworowych, specyfika lokalizacji glejaków, obecność środowiska hipoksji korelujące z opornością na chemioterapię, sprawiają, iż kierunek ten zyskuje nowe znaczenie i może stanowić proste, ale skuteczne narzędzie do ograniczenia proliferacji komórek glejaka i ich eliminacji. W ramach niniejszej pracy doktorskiej nie prowadzono badań na modelach zwierzęcych, lecz projekt OPUS, którego

częścią jest niniejsza rozprawa, przewiduje weryfikację najbardziej obiecujących cząsteczek w mysim modelu GBM. Co więcej, nowe pochodne 2-DG mogą stanowić obiecujących kandydatów do terapii skojarzonej z innymi zarejestrowanymi już w terapii lekami lub cząsteczkami o działaniu przeciwnowotworowym (jak np. inhibitory deacetylaz histonów).

Podsumowując można stwierdzić, iż nowe pochodne 2-DG stanowią obiecujący kierunek badań terapii glejaka wielopostaciowego i powinny być nadal rozwijane w kierunku ich wdrożenia w klinice. Dodatkowo, prowadzone prace syntez mają na celu kolejne modyfikacje chemiczne cząsteczki 2-DG, podstawianie do jej struktury nowych grup funkcyjnych, w poszukiwaniu jeszcze bardziej efektywnych i bezpiecznych inhibitorów glikolizy. Niniejsza praca doktorska, poza analizą właściwości biologicznych zsyntetyzowanych pochodnych 2-DG, zawiera także opracowany zestaw analiz, które pozwalają na wielokierunkowe i rzetelne weryfikowanie potencjału cytotoksycznego nowych cząsteczek.

6. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych prac badawczych sformułowano następujące wnioski:

1. Wszystkie badane związki (2-DG, 2-FG, 2-FM, 2,2-diFG, 2-IG, 2-IM, 2-CG, 2-CM, 2-BG, 2-BM, WP1122) zależnie od dawki obniżają żywotność komórek GBM a skuteczność ich działania jest skorelowana z wielkością atomu halogenku w ich strukturze. Związkami o najwyższym potencjale przeciwnowotworowym są fluoropochodne oraz acetylowana pochodna 2-DG - WP1122.
2. Chloro- i bromo- pochodne wykazują najniższą cytotoksyczność wobec komórek GBM co wskazuje, że rodzaj podstawnika w związku i stosunkowo niewielkie zmiany strukturalne istotnie wpływają na aktywność biologiczną związków. Pochodne halogeno-mannozy nie wykazują istotnych różnic w cytotoksyczności względem halogeno-pochodnych glukozy, zatem rodzaj podstawnika, ale nie jego położenie w przestrzeni wpływa na aktywność biologiczną badanych związków.
3. Związkami najsilniej hamującymi aktywność HK II w układzie pozakomórkowym są fluoro- i jodopochodne 2-DG.
4. Analiza zróżnicowanego hamowania aktywności HK II będzie możliwa po uzyskaniu kryształów rekombinowanego białka w obecności halogenopochodnych lub po przeprowadzeniu analiz modelowania molekularnego. Krystalizacja białek jest procesem trudnym i uzyskanie satysfakcjonujących kryształów jest bardzo czasochłonne. Nadal trwają próby krystalizacji rekombinowanej HK II.

7. Piśmiennictwo

- [1] Siegel, R.; Miller, K.; Jemal, A.; Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 2015, 65, 5-29.
- [2] Song, Q.; Merajver, S.D.; Li, J.Z. Cancer classification in the genomic era: five contemporary problems. *Hum. Genomics* 2015, 9:27.
- [3] Wang, L.H.; Wu C.F.; Rajasekaran, N.; Shin, Y.K. Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. *Cell Physiol. Biochem.* 2018, 51, 2647-2693.
- [4] Greavez, M.; Maley, C.C. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012, 481, 306-313.
- [5] Pan, W.; Ferguson, S.; Lam, S. Patient and treatment factors associated with survival among adult glioblastomas patients: a USA population-based study from 2000–2010. *J. Neurosci.* 2015, 22, 1575–1581.
- [6] Shah, S.S.; Rodriguez, G.A.; Musick, A.; Walters, W.M.; de Cordoba, N.; Barbarite, E.; Marlow, M.M.; Marples, B.; Prince, J.S.; Komotar, R.J.; Graham, R.M. Targeting glioblastoma stem cells with 2-deoxy-Deoxy-D-glucose (2-DG) potentiates radiation-induced unfolded protein response (UPR). *Cancers* 2019, 11(2), 159.
- [7] Thakkar, J.P.; Dolecek, T.A.; Horbinski, C. Ostrom, Q.T.; Lightner, D.D.; Barnholtz-Solan, J.; Villano, J.L. Epidemiologic and molecular prognostic review of Glioblastoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2014, 23, 1985–1985.
- [8] Amelot, A.; De Cremoux, P.; Quillien V. IDH-Mutation is a weak predictor of long-term survival in glioblastoma patients. *PLoS One* 2015, 10.
- [9] Ohgaki, H.; Kleihues, P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta. Neuropathol.* 2005, 109, 93–93.
- [10] Ohgaki, H. Epidemiology of brain tumors. *Methods Mol. Biol.* 2009, 472, 323–323.
- [11] Fisher, J.L.; Schwartzbaum, J.A.; Wrensch, M.; Wiemels, J.L. Epidemiology of brain tumors. *Neurol. Clin.* 2007, 25, 867–867.
- [12] Aldape, K.; Zadeh, G.; Mansouri, S.; Reifenberger, G.; von Deimling, A. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta. Neuropathol.* 2015, 129, 829–829.
- [13] Nakada, M.; Kita, D.; Watanabe, Hayashi, Y.; Teng, L.; Pyko, I.V.; Hamada, J-I. Aberrant signaling pathways in glioma. *Cancers* 2011, 3, 3242–3242.
- [14] Agnihotri, S.; Burrell, K.E.; Wolf, A.; Jalali, S.; Hawkins, C.; Rutka, T.; Zadeh, G. Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. *AITE* 2013, 61, 25–25.
- [15] Nelson, S.J.; Cha, S. Imaging glioblastoma multiforme. *J. Cancer* 2003, 9, 134–134.
- [16] Kesari, S. Understanding glioblastoma tumor biology: the potential to improve current diagnosis and treatments. *Semin. Oncol.* 2011, 38, 2–2.

- [17] Mrugala, M.M. Advances and challenges in the treatment of glioblastoma: a clinician's perspective. *Discov. Med.* 2013, 15, 221–221.
- [18] Singh, N.; Miner, A.; Hennis, L.; Mittal, S. Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma - a comprehensive review. *Cancer Drug Resist.* 2021, 4(1), 17–43.
- [19] Happold, C.; Roth, P.; Wick, W.; Schmidt, N.; Florea, A-M.; Silginer, M.; Reifenberger, G.; Weller, M. Distinct molecular mechanisms of acquired resistance to temozolomide in glioblastoma cells. *J. of Neurochem.* 2012, 122(2), 444-55.
- [20] Pan, Q.; Yang, X.J.; Wang, H.M., Li, Y.; Li, J-M. Chemoresistance to temozolomide in human glioma cell line U251 is associated with increased activity of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and can be overcome by metronomic temozolomide regimen. *Cell Biochem. and Biophysics.* 2012, 62(1), 185–191.
- [21] Sengupta, S.; Marrinan, J.; Frishman, C.; Sampath, P. Impact of temozolomide on immune response during malignant glioma chemotherapy. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 2012, 831090.
- [22] Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, 100, 57–70.
- [23] Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011, 144, 646–674.
- [24] Batra, S.; Adekola, K.; Rosen, S.; Shanmugam, M.; Cancer metabolism as a therapeutic target. *Oncology* 2013, 27(5), 460-67.
- [25] Warburg, O. Versuche an uberlebendem carcinomgewebe. *Klin. Wochenschr.* 1923, 2, 776–777
- [26] Koppenol, W.H.; Bounds, P.L.; Dang, C.V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat. Rev. Cancer* 2011; 11, 325–337.
- [27] Vlassenko, A. G.; McConathy, J.; Couture, L. E.; Su, Y.; Massoumzadeh, P.; Leeds, H. S.; Chicoine, M. R.; Tran, D. D.; Huang, J.; Dahiya, S.; Marcus, D. S.; Fouke, S. J.; Rich, K. M.; Raichle, M. E.; Benzinger, T. L. Aerobic Glycolysis as a Marker of Tumor Aggressiveness: Preliminary Data in High Grade Human Brain Tumors. *Disease Markers* 2015, 874904.
- [28] Zhang, W.; Gai, C.; Ding, D.; Wang, F.; Li, W. Targeted p53 on Small-Molecules-Induced Ferroptosis in Cancers. *Front. Oncol.* 2018, 8, 507.
- [29] Chang, C.H.; Qiu, J.; O'Sullivan D.; Buck, M.D.; Noguchi, T.; Curtis, J.D.; Chen, Q.; Gindin, M.; Gubin, M.M.; van der Windt, G.J.W.; Tonc, E.; Schreiber, R.D.; Pearce, E.J.; Pearce, E.L. Metabolic competition in the tumor microenvironment is a driver of cancer progression. *Cell* 2015, 162, 1229-1241.
- [30] Ho, P.C.; Bihuniak, J.D.; Macintyre, A.N.; Staron, M.; Liu, X.; Amezcua, R. Tsui, Y. C.; Cui, G.; Micevic, G.; Perales, J. C.; Kleinstein, S. H.; Abel, E. D.; Insogna, K. L.; Feske, S.;

- Locasale, J. W.; Bosenberg, M. W.; Rathmell, J. C.; Kaech, S. M. Phosphoenolpyruvate is a metabolic checkpoint of anti-tumor T cell responses. *Cell* 2015, 162, 1217-1228.
- [31] Pecorino, L. Molecular biology of cancer, mechanisms, targets and therapeutics, *Oxford University Press* 2016, 1-15, 18.
- [32] Chourpiliadis, C.; Mohiuddin, S.S. Biochemistry, Gluconeogenesis. StatPearls, *Treasure Island (FL)*, 2021.
- [33] Wood, I.S.; Trayhurn, P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): Expanded families of sugar transport proteins. *Br. J. Nutr.* 2003, 89, 3–9.
- [34] Uldry, M.; Ibberson, M.; Hosokawa, M.; Thorens, B. GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Lett.* 2002, 524, 199–203.
- [35] Vera, J.C.; Rosen, O.M. Functional expression of mammalian glucose transporters in *Xenopus laevis* oocytes: evidence for cell-dependent insulin sensitivity. *Mol. Cell. Biol.* 1989, 9, 4187–4195.
- [36] Herling, A.; König, M.; Bulik, S.; Holzhütter, H.G. Enzymatic features of the glucose metabolism in tumor cells. *FEBS J.* 2011, 278, 2436–2459.
- [37] Ganapathy, V.; Thangaraju, M.; Prasad, P.D. Nutrient transporters in cancer: Relevance to Warburg hypothesis and beyond. *Pharmacol. Ther.* 2009, 121, 29–40.
- [38] Wilson, D.F. Oxidative phosphorylation: Regulation and role in cellular and tissue metabolism. *J. Physiol.* 2017, 595, 7023–7038.
- [39] Vander Heiden, M.G.; Cantley, L.C.; Thompson, C.B. Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009, 324, 1029–1033.
- [40] Jose, C.; Bellance, N.; Rossignol, R. Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: A tumor's dilemma? *Biochim. Biophys. Acta* 2011, 1807, 552–561.
- [41] Pająk, B.; Siwiak, E.; Sołtyka, M.; Priebe, A.; Zieliński, R.; Fokt, I.; Ziemniak, M.; Jaśkiewicz, A.; Borowski, R.; Domoradzki, T.; Priebe, W. 2-Deoxy-d-Glucose and Its Analogs: From Diagnostic to Therapeutic Agents. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 21(1), 234.
- [42] Mercier, I.; Casimiro, M.C.; Wang, C.; Rosenberg, A.L.; Quong, J.; Minkeu, A.; Allen, K.G.; Danilo, C.; Sotgia, F.; Bonuccelli, G.. Human Breast Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs) Show Caveolin-1 down-Regulation and RB Tumor Suppressor Functional Inactivation: Implications for the Response to Hormonal Therapy. *Cancer Biol. Ther.* 2008, 7, 1212–1225.
- [43] Infantino, V.; Santarsiero, A.; Convertini, P.; Todisco, S.; Iacobazzi, V. Cancer Cell Metabolism in Hypoxia: Role of HIF-1 as Key Regulator and Therapeutic Target. *Int. J. of Mol. Sci.* 2021, 22(11), 5703.

- [44] Prabhakar, N.R.; Semenza, G.L. Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiol. Rev.* 2012, 92, 967–1003.
- [45] Markowska, J.; Mądry, R.; Grabowski, J.P. Niedotlenienie w raku szyjki macicy a odpowiedź na leczenie. *Współ. Onkol.* 2008, 12, 11–16.
- [46] Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factor 1: control of oxygen homeostasis in health and disease. *Pediatr. Res.* 2001, 49, 614–617.
- [47] Brahimi-Horn, M.C.H.; Chiche, J.; Pauyssegur, J. Hypoxia and cancer. *J. Mol. Med.* 2007, 85, 1301–1307.
- [48] Reszec, J.; Rutkowski, R.; Chyczewski, L. The expression of hypoxia-inducible factor-1 in primary brain tumors. *Int. J. Neurosci.* 2013, 123, 657–662.
- [49] Fukuda, R.; Zhang, H.; Kim, J.W.; Shimoda, L.; Dang, L.C.; Semenza, G.L. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* 2007, 129, 111–122.
- [50] Land, S.C.; Tee, A.R. Hypoxia-inducible factor 1 is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 20534–20543.
- [51] Hayashi, M.; Sakata, M.; Takeda, T.; Yamamoto, T.; Okamoto, Y.; Sawada, K.; Kimura, A.; Minekawa, R.; Tahara, M.; Tasaka, K.; Murata, Y. Induction of glucose transporter 1 expression through hypoxia-inducible factor 1 α under hypoxic conditions in trophoblast-derived cells. *J. Endocrinol.* 2004, 183, 145–154.
- [52] Kierans, S.J.; Taylor, C.T. Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. *J. Physiol.* 2021, 599, 23–37.
- [53] Dery, M.A.; Michaud, M.D.; Richard, D.E. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int. J. Biochem. Cell. Bio.* 2004, 37, 535–540.
- [54] Hewitson, K.S.; Schofield, C.J. The HIF pathway as a therapeutic target. *Drug. Discov. Today* 2004, 9, 704–711.
- [55] Vaupel, P. The Role of Hypoxia-Induced Factors in Tumor Progression. *The Oncologist* 2004, 9, 10–17.
- [56] Richard, D.E.; Berra, E.; Pouyssegur, J. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 α in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 26765–26771.
- [57] Zagzag, D.; Zhong, H.; Scalzitti, J.M.; Laughner, E.; Simons, J.W.; Semenza, G.L. Expression of hypoxia-inducible factor 1 α in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer* 2000, 88, 2606–2618.

- [58] Wolf, A.; Agnihotri, S.; Guha, A. Targeting metabolic remodeling 320 in glioblastoma multiforme. *Oncotarget* 2010, 1, 552–62.
- [59] Parsons, D.W.; Jones, S.; Zhang, X.; Lin, J.C.; Leary, R.J.; Angendent, P.; Mankoo, P.; Carter, H.; Siu, I.M.; Gallia, G.L.; Olivi, A.; McLendon, R.; Rasheed, B.A.; Keir, S.; Nikolskaya, T.; Niklsky, Y.; Busam, D.A.; Tekleab, H.; Diaz, L.A. Jr.; Hartigan, J.; Smith, D.R.; Strausberg, R.L.; Marie, S.K.; Shinjo, S.M.; Roggins, G.J.; Bigner, D.D.; Karchin, R.; Papadopoulous, N.; Parmigiani, G.; Vogelstein, B.; Velculescu, V.E.; Kinzler, K.W. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008, 321(5897), 1807-12.
- [60] Potemski, P. The molecular basis for treatment of gliomas. *Onkol. Prak. Klin.* 2010, 6, 73–78.
- [61] Zhao, S.; Lin, Y.; Xu, W.; Jiang, W.; Zha, Z.; Wang, P.; Yu, W.; Li, Z.; Gong, L.; Peng, Y.; Ding, J.; Lei, Q.; Guan, K.L.; Xiong, Y. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 alpha. *Science* 2009, 324, 261–265.
- [62] Kroemer, G.; Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer’s Achilles’ heel. *Cancer Cell* 2008, 13, 472-482.
- [63] Hamanaka, R.B.; Chandel, N.S. Targeting glucose metabolism for cancer therapy. *J. Exp. Med.* 2012, 209, 211-215.
- [64] Christofk, H.R.; Vander Heiden, M.G.; Harris, M.H.; Ramanathan, A.; Gerszten, R.E.; Wei, R.; Fleming, M.D.; Schreiber, S.L.; Cantley, L.C. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumor growth. *Nature* 2008, 452, 230-23
- [65] Israelsen, W.J.; Vander Heiden, M.G. Pyruvate kinase: function, regulation and role in cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2015, 43, 43-51.
- [66] Mazurek, S. Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2011, 43(7), 969–980.
- [67] Zahra, K.; Dey, T.; Ashish, Mishra, S. P.; Pandey, U. Pyruvate Kinase M2 and Cancer: The Role of PKM2 in Promoting Tumorigenesis. *Front. Onkol.* 2020, 10, 159.
- [68] Luo, W.; Semenza, G.L. Pyruvate kinase M2 regulates glucose metabolism by functioning as a coactivator for hypoxia-inducible factor 1 in cancer cells. *Oncotarget* 2011, 2, 551–556
- [69] Hardt, P.R.; Ewald, N. Tumor M2 pyruvate kinase: a tumor marker and its clinical application in gastrointestinal malignancy. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2008, 8, 579–585.
- [70] Grüning, N.M.; Ralser, M. Cancer: Sacrifice for survival. *Nature* 2011, 480, 190–1
- [71] Le, A.; Cooper, C.R.; Gouw, A.M.; Dinavahi, R.; Maitra, A., Deck, L.; Royer, R.E.; Vander Jagt, D.; Semenza, G.L.; Dang, C.V. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces

oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, 107(5), 2037–2042.

[72] Firth, J.D.; Ebert, B.L.; Ratcliffe, P.J. Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 21021–21027.

[73] Ullah, M.S.; Davies, A.J.; Halestrap, A.P. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 9030–9037.

[74] Katzen, H.M.; Schimke, R.T. Multiple forms of hexokinase in the rat: tissue distribution, age dependency, and properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1965, 54, 1218–1225.

[75] Liu, Y., Wu, K., Shi, L., Xiang, F., Tao, K., & Wang, G. (). Prognostic Significance of the Metabolic Marker Hexokinase-2 in Various Solid Tumors: A Meta-Analysis. *PloS One* 2016, 11(11), e0166230.

[76] Bacci, M.; Giannoni, E.; Fearn, A.; Ribas, R.; Gao, Q.; Taddei, M.L.; Pintus, G.; Dowsett, M.; Isacke, C.M.; Martin, L.A.; Chiarugi, P.; Morandi A. miR-155 drives metabolic reprogramming of ER+ breast cancer cells following long-term estrogen deprivation and predicts clinical response to aromatase inhibitors. *Cancer Res.* 2016, 76, 1615–26.

[77] Van't Veer, L.J.; Dai, H.; van de Vijver, M.J.; He, Y.D.; Hart, A.A.; Mao, M.; Peterse, H.L.; van der Kooy, K.; Marton, M.J.; Witteveen, A.T.; Schreiber, G.J.; Kerkhoven, R.M.; Roberts, C.; Linsley, P.S.; Bernards, R.; Friend, S.H. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002, 415, 530–6.

[78] Yang, X.; Cheng, Y.; Li, P.; Tao, J.; Deng, X.; Zhang, X.; Gu, M.; Lu, Q.; Yin, C. A lentiviral sponge for miRNA-21 diminishes aerobic glycolysis in bladder cancer T24 cells via the PTEN/PI3K/AKT/mTOR axis. *Tumour Biol.* 2015, 36, 383–91.

[79] Huang, X.; Liu, M.; Sun, H.; Wang, F.; Xie, X.; Chen, X.; Su, J.; He, Y.; Dai, Y.; Wu, H.; Shen, L. HK2 is a radiation resistant and independent negative prognostic factor for patients with locally advanced cervical squamous cell carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015, 8, 4054–63.

[80] Iwamoto, M.; Kawada, K.; Nakamoto, Y.; Itatani, Y.; Inamoto S, Toda K, Kimura, H.; Sasazuki, T.; Shirasawa, S.; Okuyama, H.; Inoue, M.; Hasegawa, S.; Togashi, K.; Sakai, Y. Regulation of 18F-FDG accumulation in colorectal cancer cells with mutated KRAS. *J. Nucl. Med.* 2014, 55, 2038–44.

- [81] Jin, Z.; Gu, J.; Xin, X.; Li, Y.; Wang, H. Expression of hexokinase 2 in epithelial ovarian tumors and its clinical significance in serous ovarian cancer. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 2014, 35, 519–24.
- [82] Wolf, A.; Agnihotri, S.; Micallef, J.; Mukherjee, J.; Sabha, N.; Cairns, R.; Hawkins, C.; Guha, A. Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme. *J. Exp. Med.* 2011, 208, 313–26.
- [83] Kwee, S.A.; Hernandez, B.; Chan, O.; Wong, L. Choline kinase alpha and hexokinase-2 protein expression in hepatocellular carcinoma: association with survival. *PLoS One* 2012, 7, e46591.
- [84] Chen, J.; Zhang, S.; Li, Y.; Tang, Z.; Kong, W. Hexokinase 2 overexpression promotes the proliferation and survival of laryngeal squamous cell carcinoma. *Tumour Biol.* 2014, 35, 3743–53.
- [85] Wang, H.; Wang, L.; Zhang, Y.; Wang, J.; Deng, Y.; Lin, D. Inhibition of glycolytic enzyme hexokinase II (HK2) suppresses lung tumor growth. *Cancer Cell Int.* 2016, 16, 38.
- [86] Ogawa, H.; Nagano, H.; Konno, M.; Eguchi, H.; Koseki, J.; Kawamoto, K.; Nishida, N.; Colvin, H.; Tomokuni, A.; Tomimaru, Y.; Hama, N.; Wada, H.; Marubashi, S.; Kobayashi, S.; Mori, M.; Doki, Y.; Ishii, H. The combination of the expression of hexokinase 2 and pyruvate kinase M2 is a prognostic marker in patients with pancreatic cancer. *Mol. Clin. Oncol.* 2015, 3, 563–571.
- [87] Wang, L.; Xiong, H.; Wu, F.; Zhang, Y.; Wang, J.; Zhao, L.; Guo, X.; Chang, L.J.; Zhang, Y.; You, M.J.; Koochekpour, S.; Saleem, M.; Huang, H.; Lu, J.; Deng, Y. Hexokinase 2-mediated Warburg effect is required for PTEN- and p53-deficiency-driven prostate cancer growth. *Cell Rep.* 2014, 8, 1461–74.
- [88] Van Schaftingen, E. Hexokinase/glucokinase. *Encyclopedia of Biological Chemistry, Elsevier* 2013, 43-547.
- [89] Botzer, L.E.; Maman, S.; Sagi-Assif, O.; Meshel, T.; Nevo, I.; Yron I.; Witz, I.P. Hexokinase 2 is a determinant of neuroblastoma metastasis. *Br. J. Cancer* 2016, 114, 759–766
- [90] Pelicano, H.; Martin, D.; Xu, R. Huang, P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 2006, 25, 4633–4646.
- [91] Adekola, K.; Rosen, S.T.; Shanmugam, M. Glucose transporters in cancer metabolism. *Curr. Opin. Oncol.* 2012, 24(6), 650-654.
- [92] Kubik, J.; Humeniuk, E.; Adamczuk, G.; Madej-Czerwonka, B.; Korga-Plewko, A. Targeting Energy Metabolism in Cancer Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 5572.

- [93] Gong, L.; Wei, Y.; Yu, X.; Peng, J.; Leng, X. 3-Bromopyruvic acid, a hexokinase II inhibitor, is an effective antitumor agent on hepatoma cells: In vitro and in vivo findings. *Anticancer Agents Med. Chem.* 2014, 14,771–776.
- [94] Ralph, S.J. Arsenic-based antineoplastic drugs and their mechanisms of action. *Met. Based Drugs* 2008, 2008, 260146.
- [95] Chen, Z.; Zhang, H.; Lu, W.; Huang, P. Role of mitochondria-associated hexokinase II in cancer cell death induced by 3-bromopyruvate. *Biochim. Biophys. Acta* 2009, 1787, 553–560.
- [96] Ko, Y.H.; Smith, B.L.; Wang, Y.; Pomper, M.G.; Rini, D.A.; Torbenson, M.S.; Hullihen, J.; Pedersen, P.L. Advanced cancers: eradication in all cases using 3 bromopyruvate therapy to deplete ATP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 324, 269–275.
- [97] Xu, R.H.; Pelicano, H.; Zhou, Y.; Carew, J.S.; Feng, L.; Bhalla, K.N.; Keating, M.J.; Huang, P. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res.* 2005, 65, 613–621.
- [98] Danial, N.N.; Gramm, C.F.; Scorrano, L.; Zhang, C.Y.; Krauss, S.; Ranger, A.M.; Datta, S.R.; Greenberg, M.E.; Licklider, L.J.; Lowell, B.B.; Gygi, S.P.; Korsmeyer, S.J. Bad and luciferase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* 2003, 424, 952–956.
- [99] Kunjithapatham, R.; Geschwind, J.-F.H.; Rao, P.P.; Boronina, T.N.; Cole, R.N.; Ganapathy-Kanniappan, S. Systemic administration of 3-bromopyruvate reveals its interaction with serum proteins in a rat model. *BMC Res. Notes* 2013, 6, 277.
- [100] Navale, A.M.; Paranjape, A.N. Glucose transporters: Physiological and pathological roles. *Biophys. Rev.* 2016, 8, 5–9.
- [101] Cura, A.J.; Carruthers, A. Role of monosaccharide transport proteins in carbohydrate assimilation, distribution, metabolism, and homeostasis. *Compr. Physiol.* 2012, 2, 863–914.
- [102] Kurtoglu, M.; Gao, N.; Shang, J.; Maher, J.C. Under normoxia, 2-deoxy-D-glucose elicits cell death in select tumor types not by inhibition of glycolysis but by interfering with N-linked glycosylation. *Mol. Cancer Ther.* 2007, 6(11), 3049-3057.
- [103] Ralser, M.; Wamelink, M.M.; Struys, E.A.; Joppich, C.; Krobitsch, S.; Jakobs, C.; Lehrach, H. A catabolic block does not sufficiently explain how 2-deoxy-D-glucose inhibits cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008, 105, 17807–17811.
- [104] Urakami, K.; Zangiacoimi, V.; Yamaguchi, K.; Kusuhara, M. Impact of 2-deoxy-D-glucose on the target metabolome profile of a human endometrial cancer cell line. *Biomed. Res.* 2013, 34, 221–229.

- [105] Robinson, G.L.; Dinsdale, D.; Macfarlane, M.; Cain, K. Switching from aerobic glycolysis to oxidative phosphorylation modulates the sensitivity of mantle cell lymphoma cells to TRAIL. *Oncogene* 2012, 31, 4996–5006.
- [106] Zagorodna, O.; Martin, S.M.; Rutkowski, D.T.; Kuwana, T.; Spitz, D.R.; Knudson, C.M. 2-deoxyglucose-induced toxicity is regulated by Bcl-2 family members and is enhanced by antagonizing Bcl-2 in lymphoma cell lines. *Oncogene* 2012, 31, 2738–2749.
- [107] Golding, J.P.; Wardhaugh, T.; Patrick, L.; Turner, M.; Phillips, J.B.; Bruce, J.I.; Kimani, S.G. Targeting tumour energy metabolism potentiates the cytotoxicity of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Br. J. Cancer* 2013, 109, 976–982.
- [108] Rehman, G.; Shehzad, A.; Laif, Khan, A.; Hamayun, M. Role of AMP-Activated Protein Kinase in Cancer Therapy. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 2014, 347, 457-464.
- [109] Dziwulska, A.; Dobrzyń, P.; Dobrzyń, A. Rola kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK) w regulacji metabolizmu mięśni szkieletowych. *Postępy Hig. Med. Dosw.* 2010, 64, 513-521.
- [110] Green, A.; Chapuis, N.; Lacombe, C.; Mayeux, P.; Bouscary, D.; Tamburini, J. LKB1/AMPK/mTOR signaling pathway in hematological malignancies. *Cell Cycle* 2011, 13, 2116-2118.
- [111] Steinberg, G.; Kemp, B.; AMPK in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 2009, 3, 1025-1078.
- [112] Bjornsti, M.A.; Houghton, P.J. The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 2004, 4, 335-348.
- [113] Jung, C.H.; Ro, S.-H.; Cao, J.; Otto, N.M.; Kim, D.H. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett.* 2010, 584, 1287–1295.
- [114] Avalos, Y.; Canales, J.; Bravo-Sagua, R.; Criollo, A.; Lavandero, S.; Quest, A. Tumor Suppression and Promotion by Autophagy. *BioMed Res. Int.* 2014, 1-7.
- [115] Colell, A.; Ricci, J.E.; Tait, S.; Milasta, S.; Maurer, U.; Bouchier-Hayes, L.; Fitzgerald, P.; Guio-Carrion, A.; Waterhouse, N.J.; Li, C.W. Mari, B.; Barbry, P.; Newmeyer, D.D.; Beere, H.M.; Green, D.R. GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. *Cell* 2007, 129, 983-997.
- [116] Rabinowitz, J.D.; White E. Autophagy and metabolism. *Science* 2010, 330, 1344-1348.
- [117] Matsui, Y.; H. Takagi, X.; Qu, M.; Abdellatif, H.; Sakoda, T.; Asano, B. Levine, J. Sadoshima Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ. Res.* 2007, 100, 914-922.

- [118] Parzych, K.R.; Kilondky, D.J. An overview of autophagy: morphology, mechanism and regulation. *Antioxid. Redox. Signal.* 2014, 20(3), 460-473.
- [119] Kondo, Y.; Kanzawa, T.; Sawaya, R.; Kondo, S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat. Rev. Cancer* 2005, 5, 726–734.
- [120] Lamparska-Przybysz, M.; Motyl, T. Autofagia – narzędzie przeżycia czy śmierci komórki nowotworowej? *Post. Biol. Kom.* 2005, 32, 13–22.
- [121] Mehrpour, M.; Esclatine, A.; Beau, I.; Codogno, P. Overview of macro-autophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res.* 2010, 20, 748–762.
- [122] Kulkarni, Y.M.; Kaushik, V.; Azad, N.; Wright, C.; Rojanasakul, Y.; O’Doherty, G.; Iyer, A.K.V. Autophagy-induced apoptosis in lung cancer cells by a novel digitoxin analog. *J. Cell. Physiol.* 2016, 231, 817–828.
- [123] Mathew, R.; Karantza-Wadsworth, V.; White, E. Role of autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2007, 7, 961–967.
- [124] Levine, B.; Kroemer, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008, 132, 27–42.
- [125] Yang, S.; Wang, X.; Contino, G.; Liesa, M.; Sahrin, E.; Ying, H.; Bause, A.; Li, Y.; Stommel, I.M.; Dell’antonio, G.; Mautner, J.; Tonon, G.; Haigis, M.; Shirihai, O.S.; Doglioni, C.; Bardeesy, N.; Kimmelman, A.c. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes. Dev.* 2011,25(1),7, 717-729.
- [126] Xi, H.; Kurtoglu, M.; Liu, H.; Wangpaichitr, M.; You, M.; Liu, X.; Savaraj, N.; Lampidis, T.J. 2-deoxy-D-glucose activates autophagy via endoplasmic reticulum stress rather than ATP depletion. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2011, 67, 899–910.
- [127] Rashid, H.-O.; Yadav, R.K.; Kim, H.-R.; Chae, H.-J. ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection. *Autophagy* 2015, 11, 1956–1977.
- [128] Shutt, D.C.; O’Dorisio, M.S.; Aykin-Burns, N.; Spitz, D.R. 2-deoxy-d-glucose induces oxidative stress and cel killing in human neuroblastoma cells. *Cancer Biol. Ther.* 2010, 9, 853–861.
- [129] DiPaola, R.S.; Dvorzhinski, D.; Thalasila, A.; Garikapaty, V.; Doram, D.; May, M.; Bray, K.; Mathew, R.; Beaudoin, B.; Karp, C.; Stein, M.; Foran, D.; White, E. Therapeutic starvation and autophagy in prostate cancer: a new paradigm for targeting metabolism in cancer therapy. *Prostate* 2008, 68, 1743–1752.
- [130] Wu, H.; Zhu, H.; Liu, D. X.; Niu, T. K.; Ren, X.; Patel, R.; Hait, W.N.; Yang, J.M. Silencing of elongation factor-2 kinase potentiates the effect of 2-deoxy-D-glucose against human glioma cells through blunting of autophagy. *Cancer Res.* 2009, 69, 2453–2460.

- [131] Stein, M.; Lin, H.; Jeyamohan, C.; Dvorzhinski, D.; Gounder, M.; Bray, K.; Eddy, S.; Goodin, S.; White, E.; Dipaola, R.S. Targeting tumor metabolism with 2-deoxyglucose in patients with castrate resistant prostate cancer and advanced malignancies. *Prostate* 2010, 70, 1388–1394.
- [132] Debnath, J.; Baehrecke, E.H.; Kroemer, G. Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy* 2005, 1, 66–74.
- [133] Arends, M.J.; Wyllie, A.H. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 1991, 32, 223-54.
- [134] Zaman, S.; Wang, R.; Gandhi, V. Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies. *Leuk. Lymphoma.* 2014, 55, 1980–1992.
- [135] Lopez, J.; Tait, S. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br. J. Cancer* 2015, 112, 957–962.
- [136] Hacker, G.; Weber, A. BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how? *Arch. Biochem. Biophys.* 2007, 462, 150–155.
- [137] Merino, D.; Giam, M.; Hughes, P. D.; Siggs, O. M.; Heger, K.; O'Reilly, L. A.; Adams, J. M.; Strasser, A.; Lee, E. F.; Fairlie, W. D.; Bouillet, P. The role of BH3-only protein bim extends beyond inhibiting bcl-2-like prosurvival proteins. *J. Cell Biol.* 2009, 186, 355–362.
- [138] Tait, S.W.; Prsons, M.J.; Llambi, F.; Bouchier-Hayes, L.; Connel, S.; Munoz-Pinedo, C.; Green, D.R.; Resistance to caspase-independent cel death requires persistence of intact mitochondria. *Dev. Cell.* 2010, 18(5), 802-813.
- [139] Bratton, S.B.; Salvesen, G.S. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *J. Cell Sci.* 2010, 123(19), 3209-3214.
- [140] Ramirez-Peinado, S.; Alciazar-Limones, F.; Lagares-Tena, L.; El Mjijad, N.; Caro-Maldonado, A.; Tirado, O.M.; Munoz-Pinedo, C.; 2-deoxyglucose induces noxadependent apoptosis in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.* 2011, 71, 6796–6806.
- [141] Valera, V.; Ferretti, M.; Prabharasuth, D.; Chaimowitz, M.; Choudhury, M.; Phillips, J.; Konno, S. Is targeting glycolysis with 2-deoxyglucose a viable therapeutic approach to bladder cancer? *Int. J. Cancer Ther. Oncol.* 2017, 5(1), 511.
- [142] Muñoz-Pinedo, C.; Ruiz-Ruiz, C.; De Almodóvar, C.R.; Palacios, C.; López-Rivas, A. Inhibition of glucose metabolism sensitizes tumor cells to death receptor-triggered apoptosis through enhancement of death-inducing signaling complex formation and apical procaspase-8 processing. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 12759–12768.
- [143] Zhang, Y.; Huang, F.; Wang, J.; Luo, H.; Wang, Z. 2-DG-regulated RIP and cFLIP effect on liver cancer cells apoptosis induced by TRAIL. *Med. Sci. Monit.* 2015, 10, 3442–3448.

- [144] Schwarz, R.T.; Klenk, H.D.; Inhibition of glycosylation of the influenza virus hemagglutinin. *J. Virol.* 1974,14,1023-1034.
- [145] Berthe, A.; Zaffino, M.; Muller, C.; Foulguier, F.; Houdou, M.; Schulz, C.; Bost, F.; De Fay, E.; Mazerbourg, S.; Flament, S. Protein N-glycosylation alteration and glycolysis inhibition both contribute to the antiproliferative action of 2-deoxyglucose in breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 2018, 171(3), 581-591.
- [146] Sharma, V.; Ichikawa, M.; Freeze, H.H. Mannose metabolism: more than meets the eye. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014, 453, 220-228.
- [147] Ichikawa, M.; Scott, D.A.; Losfeld, M.E.; Freeze, H.H. The metabolic origins of mannose in glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 2014, 289, 6751-6761.
- [148] Ho, W.L.; Hsu, W.M.; Huang, M.C.; Kadomatsu, K.; Nakagawara, A. Protein glycosylation in cancers and its potential therapeutic applications in neuroblastoma. *J. Hem. Oncol.* 2016, 9(1), 100.
- [149] Suga, A.; Nagae, M.; Yamaguchi Y. Analysis of protein landscapes around N-glycosylation sites from the PDB repository for understanding the structural basis of N-glycoprotein processing and maturation. *Glycobiol.* 2018, 28(10), 774-785.
- [150] Kim, P.J.; Lee, D.Y.; Jeong, H. Centralized modularity of N-linked glycosylation pathways in mammalian cells. *PLoS One* 2009, 4(10), e7317.
- [151] Ahadova, A.; Gebert, J.; von Knebel Doeberitz, M.; Kopitz, J.; Kloor, M. Dose-dependent effect of 2-deoxy-D-glucose on glycoprotein mannosylation in cancer cells. *IUBMB Life* 2015, 67(3), 218-26.
- [152] Datema, R.; Schwarz, R. T. Formation of 2-deoxyglucose-containing lipid-linked oligosaccharides. Interference with glycosylation of glycoproteins. *Eur. J. Biochem.* 1978, 90, 505–516.
- [153] Biberich, E. Synthesis, processing, and function of N-glycans in N-glycoproteins. *Adv. Neurobiol.* 2014, 9, 47-70.
- [154] Xi, H.; Kurtoglu, M.; Lamipidis, T.J. The wonders of 2-deoxy-d-glucose. *IUBMB J.* 2014, 66, 110–121.
- [155] Datema, R.; Schwarz, R.T. Interference with glycosylation of glycoproteins. *Biochem. J.* 1979, 184, 113–23.
- [156] Schmidt, M. F.; Schwarz, R. T.; Scholtissek, C. Nucleoside-diphosphate derivatives of 2-deoxy-D-glucose in animal cells. *Eur. J. Biochem.* 1974, 49, 237–247.

- [157] Datema, R.; Schwarz, R. T.; Jankowski, A. W. Fluoroglucose-inhibition of protein glycosylation in vivo. Inhibition of mannose and glucose incorporation into lipid-linked oligosaccharides. *Eur. J. Biochem.* 1980, 109, 331–341.
- [158] Leon-Annicchiarico, C.L.; Ramirez-Peinado, S.; Dominguez-Villanueva, D.; Gonsberg, A.; Lampidis, T.J.; Munoz-Pinedo, C. ATF4 mediates necrosis induced by glucose deprivation and apoptosis induced by 2-deoxyglucose in the same cells. *FEBS J.* 2015, 282, 3647-3658.
- [159] Zhelev, Z.; Ivanova, D.; Aoki, I.; Saga, T.; Bakalova, R. 2-deoxy-D-glucose sensitizes cancer cells to barasertib and everolimus by ROS-independent mechanism. *Anticancer Res.* 2015, 35(12), 6623-6632.
- [160] Raez, L.E.; Papadopoulos, K.; Ricart, A.D.; Chloean, E.G.; Dipaola, R.S.; Stein, M.N.; Rocha Lima, C.M.; Schlesselman, J.J.; Tolba, K.; Langmuir, V.K.; Kroll, S.; Jung, D.T.; Kurtoglu, M.; Rosenblatt, J.; Lampidis, T.J. A phase I dose-escalation trial of 2-deoxy-D-glucose alone or combined with docetaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2013, 71, 523–530.
- [161] El Mjiyad, N.; Caro-Maldonado, A.; Ramírez-Peinado, S.; Muñoz-Pinedo, C. Sugar-free approaches to cancer cell killing. *Oncogene* 2011, 30(3), 253-64.
- [162] Xue, C.; Wang, C Xue C., Wang C., Sun Y., Meng Q., Liu Z., Huo X., Sun P., Sun H., Ma X., Ma X., Peng J., Liu K. Targeting P-glycoprotein function, p53 and energy metabolism: Combination of metformin and 2-deoxyglucose reverses the multidrug resistance of MCF-7/Dox cells to doxorubicin. *Oncotarget.* 2017, 8, 8622-8632.
- [163] Frenzel, A.; Grespi, F.; Chmielewski, W.; Villunger, A. Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. *Apoptosis* 2009, 14, 584–596.
- [164] Cheng, Y.; Diao, D.; Zhang, H.; Guo, Q.; Wu, X.; Song, Y.; Dang, C. High glucose-induced resistance to 5-fluorouracil in pancreatic cancer cells alleviated by 2-deoxy-D-glucose. *Biomed Rep.* 2013, 9, 188-192.
- [165] Jalota, A.; Kumar, R.; Das, B.C.; Yadav, A.K.; Chosdoi, K.; Sinha, S. Synergistic increase in efficacy of a combination of 2-deoxy-d-glucose and cisplatin in normoxia and hypoxia: switch from autophagy to apoptosis. *Tumor Biol.* 2016, 37(9), 12347–12358.
- [166] Simons, A.L.; Ahmad, I.M.; Mattson, D.M.; Dornfeld, K.J.; Spitz, D.R. 2-Deoxy-d-Glucose combined with cisplatin enhances cytotoxicity via metabolic oxidative stress in human head and neck cancer cells. *Cancer Res.* 2007, 67(7), 3364-3370.
- [167] Bizjak, M.; Malavašič, P.; Dolinar, K.; Pohar, J.; Pirkmajer, S.; Pavlin, M. Combined treatment with Metformin and 2-deoxy glucose induces detachment of viable MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro. *Sci. Rep.* 2017, 7(1), 1761.

- [168] Bi, Ch.; Fu, K.; Jiang, Ch.; Huang, X.; Chan, W.C.; McKeitha, T. The combination of 2-DG and metformin inhibits the mTORC1 pathway and suppresses aggressive B cell lymphoma growth and survival. *Blood* 2013, 122, 1665.
- [169] Zhu, J.; Zheng, Y.; Zhang, H.; Sun, H. Targeting cancer cell metabolism: The combination of metformin and 2-Deoxyglucose regulates apoptosis in ovarian cancer cells via p38 MAPK/JNK signaling pathway. *Am. J. Transl. Res.* 2016, 8(11), 4812-4821.
- [170] Kim, E.H.; Lee, J.H.; Oh, Y.; Koh, I.; Shim, J.K.; Park, J.; Chol, J.; Yun, M.; Jeon, J.Y.; Huh, Y.M.; Chang, J.H.; Kim, S.H.; Kim, K.S.; Cheong, J.H.; Kim, P.; Kang, S.G. Inhibition of glioblastoma tumor spheres by combined treatment with 2-deoxyglucose and metformin. *Neuro. Oncol.* 2017, 9(2), 197-207.
- [171] Pattni, B.S.; Jhaveri, A.; Dutta, I.; Baleja, J.D.; Degterev, A.; Torchilin, V. Targeting energy metabolism of cancer cells: combined administration of NCL-240 and 2-DG. *Int. J. Pharm.* 2017, 532(1), 149-156.
- [172] Wang, S.Y.; Wei, Y.H.; Shieh, D.B.; Lin, L.L.; Cheng, S.P.; Wang, P.W.; Chuang, J.H. 2-Deoxy-D-glucose can complement doxorubicin and sorafenib to suppress the growth of papillary thyroid carcinoma cells. *PLoS One* 2015, (7), e0130959.
- [173] Ahmad, I.M.; Mustafa, E.H.; Mustafa, N.H.; Tahtamouni, L.H.; Abdalla, M.Y. 2-DG enhances the susceptibility of breast cancer cells to doxorubicin. *Central Eur. J. Biol.* 2010, 5(6), 739–748.
- [174] Cao, X.; Fang, L.; Gibbs, S.; Huang, Y.; Dai, Z.; Wen, P.; Zheng, X.; Sadee, W.; Sun, D. Glucose uptake inhibitor sensitizes cancer cells to daunorubicin and overcomes drug resistance in hypoxia. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2007, 59(4), 495-505.
- [175] Reyes, R.; Wani, N.A.; Ghoshal, K.; Jacob, S.T.; Motiwala, T. Sorafenib and 2-Deoxyglucose synergistically inhibit proliferation of both sorafenib sensitive and resistant HCC cells by inhibiting ATP production. *Gene Expr.* 2017, 17(2), 129–140.
- [176] Tomizawa, M.; Shinozaki, F.; Motoyoshi, Y.; Sugiyama, T.; Yamamoto, S.; Ishige, N. 2-Deoxyglucose and sorafenib synergistically suppress the proliferation and motility of hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Lett.* 2017, 13(2), 800-804.
- [177] Maschek, G.; Savaraj, N.; Priebe, W.; Braunschweiger, P.; Hamilton, K.; Tidmarsh, G.F.; De Young, L.R.; Lampidis, T.J. 2-deoxy-D-glucose increases the efficacy of Adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers in vivo. *Cancer Res.* 2004, 64(1), 31-4.
- [178] Goldberg, L.; Israeli, R.; Kloog, Y. FTS and 2-DG induce pancreatic cancer cell death and tumor shrinkage in mice. *Cell Death Dis.* 2012, 3, e284.

- [179] Fan, L.X.; Liu, C.M.; Gao, A.H.; Zhou, Y.B.; Li, J. Berberine combined with 2-deoxy-D-glucose synergistically enhances cancer cell proliferation inhibition via energy depletion and unfolded protein response disruption. *Biochim. Biophys. Acta* 2013, 1830(11), 5175-83.
- [180] Liu, H.; Kurtoglu, M.; León-Annicchiarico, C.L.; Munoz-Pinedo, C.; Barredo, J.; Leclerc, G.; Merchan, J.; Liu, X.; Lampidis, T.J. Combining 2-deoxy-D-glucose with fenofibrate leads to tumor cell death mediated by simultaneous induction of energy and ER stress. *Oncotarget* 2016, 7(24), 36461-36473.
- [181] Graham, R.M.; Hernandez, F.; Puerta, N.; De Angulo, G.; Webster, K.A.; Vanni, S. Resveratrol augments ER stress and the cytotoxic effects of glycolytic inhibition in neuroblastoma by downregulating Akt in a mechanism independent of SIRT1. *Exp. Mol. Med.* 2016, 48, e210.
- [182] Cheng, G.; Zielonka, J.; Dranka, B.P.; McAllister, D.; Mackinnon, A.C.; Joseph, J.; Kalyanaraman, B. Mitochondria targeted drugs synergize with 2-deoxyglucose to trigger breast cancer cell death. *Cancer Res.* 2012, 72, 2634-2644.
- [183] Pang, Y.Y.; Wang, T.; Chen, F.Y.; Wu, Y.L.; Shao, X.; Xiao, F.; Huang, H.H.; Zhong, H.; Zhong, J.H. Glycolytic inhibitor 2-deoxy-d-glucose suppresses cell proliferation and enhances methylprednisolone sensitivity in non-Hodgkin lymphoma cells through down-regulation of HIF-1 α and c-MYC. *Leukemia Lymphoma* 2015, 56(6), 1821-1830.
- [184] Lei, X.; Li, K.; Liu, Y.; Wang, Z.Y.; Ruan, B.J.; Wang, L.; Xiang, A.; Wu, D.; Lu, Z. Co-delivery nanocarriers targeting folate receptor and encapsulating 2-deoxyglucose and α -tocopheryl succinate enhance anti-tumor effect in vivo. *Int. J. Nanomed.* 2017, 12, 5701-5715.
- [185] Gao, C.; Shen, Y.; Jin, F.; Miao, Y.; Qiu, X. Cancer stem cells in small cell lung cancer cell line H446: higher dependency on oxidative phosphorylation and mitochondrial substrate-level phosphorylation than non-stem cancer cells. *Plos ONE* 2016, 11.
- [186] Kennedy, C.R.; Tilkens, C.B.; Guan, H.; Garner, J.A.; Or, P.M.; Chan, A.M. Differential sensitivities of glioblastoma cell lines towards metabolic and signaling pathway inhibitions. *Cancer Lett.* 2013, 336, 299–306.
- [187] Goncalves, V.M.; Cardoso-Carneiro, D.; Valbom, I.; Cury, F.P.; Silva, V.A.; Granja, S.; Reis, R.M.; Baltazar, F.; Martinho, P. Metabolic alterations underlying Bevacizumab therapy in glioblastoma cells. *Oncotarget* 2017, 8(62), 103657-103670.
- [188] Zhao, Y.; Liu, H.; Liu, Z.; Ding, Y.; Ledoux, S.P.; Wilson, G.L.; Voellmy, R.; Lin, Y.; Lin, W.; Nahta, R.; Liu, B.; Fodstad, O.; Chen, J.; Price, J.E.; Tan, M. Overcoming Trastuzumab Resistance in Breast Cancer by Targeting Dysregulated Glucose Metabolism. *Cancer Res.* 2011, 71(13), 4585-97.

- [189] Li, L.; Fath, M.A.; Scarbrough, P.M.; Watson, W.H.; Spitz, D.R. Combined inhibition of glycolysis, the pentose cycle, and thioredoxin metabolism selectively increases cytotoxicity and oxidative stress in human breast and prostate cancer. *Redox Biol.* 2015, 4, 127-135.
- [190] Reddy, B.V.; Prasad, N.R. 2-deoxy-D-glucose combined with ferulic acid enhances radiation response in non-small cell lung carcinoma cells. *Cent. Eur. J. Biol.* 2011, 6, 743.
- [191] Singh, D.; Banerji, A.K.; Dwarakanath, B.S.; Tripathi, R.P.; Gupta, J.P.; Mathew, T.L.; Ravindranath, T.; Jain, V. Optimizing cancer radiotherapy with 2-deoxy-D-glucose dose escalation studies in patients with glioblastoma multiforme. *Strahlenther Onkol.* 2005, 181, 507–14.
- [192] Aft, R.L.; Lewis, J.S.; Zhang, F.; Kim, J.; Welch, M.J. Enhancing targeted radiotherapy by copper(II)diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone) using 2-deoxy-D-glucose. *Cancer Res.* 2003, 63(17), 5496-504.
- [193] Rae, C.; Sey, C.H.C.; Mairs, R.J. Radiosensitization of prostate cancer cells by 2-deoxy-D-glucose. *Madridge J. Oncogen.* 2018, 2(1), 30-34.
- [194] Lin, X.; Zhang, F.; Bradbury, C.M.; Kaushal, A.; Li, L.; Spitz, D.R.; Aft, R.; Gius, D. 2-deoxy-D-glucose-induced cytotoxicity and radiosensitization in tumor cells via disruption in thiol metabolism. *Cancer Res.* 2003, 63, 3413-3417.
- [195] Tamba, M.; Simone, G.; Quintiliani, M. Interactions of the Thiyl Free Radicals with Oxygen: A pulse radiolysis study. *Int. J. Rad Biol.* 1986,50,4,595-600.
- [196] Dwarakanath BS. Cytotoxicity, radiosensitization, and chemosensitization of tumor cells by 2-deoxy-D-glucose in vitro. *J. Cancer. Res. Ther.* 2009; 5(1), 27-31.
- [197] Gupta, S.; Farooque, A.; Adhikari, J.S.; Singh, S.; Dwarakanath, B.S. Enhancement of radiation and chemotherapeutic drug responses by 2-deoxy-D-glucose in animal tumors. *J. Cancer Res. Ther.* 2009, 5(1), 16-20.
- [198] Zhang, F.; Aft, R.L. Chemosensitizing and cytotoxic effects of 2-deoxy-D-glucose on breast cancer cells. *J. Cancer Res. Ther.* 2009, 5(1), 41-3.
- [199] Lampidisfoundation.org
- [200] Aft, R.L.; Zhang, F.W.; Gius, D. Evaluation of 2-deoxy-D-glucose a chemotherapeutic agent: mechanism of cell death. *Br. J. Cancer* 2002, 87, 805-12.
- [201] Hansen, I.L.; Levy, M.M.; Kerr, D.S. The 2-deoxyglucose test as a supplement to fasting for detection of childhood hypoglycemia. *Pediatrics. Res.* 1984, 18, 359–364.
- [202] Strandberg, A.Y.; Pienimaki, T.; Pitkala, K.H.; Tilvis, R.S.; Salomaa, V.V.; Strandberg, T.E. Comparison of normal fasting and one-hour glucose levels as predictors of future diabetes during a 34-year follow-up. *Ann. Med.* 2013, 45, 336–340.

- [203] Mees, G.; Dierckx, R.; Vangestel, C.; Laukens, D.; Van Damme, N.; Van de Wiele, C. Pharmacologic activation of tumor hypoxia: a means to increase tumor 2-deoxy-2-[18F]fluoro-D-glucose uptake? *Mol. Imaging* 2013,12, 49-58.
- [204] Zhou, C.; Wang, C.; Sun Zhou, H.; Luby-Phelps, K.; Mickey, B. E.; Habib, A. A.; Mason, R. P.; Zhao, D. Dynamic near-infrared optical imaging of 2-deoxyglucose uptake by intracranial glioma of athymic mice. *PloS one* 2009, 4(11), e8051
- [205] Viswanathan, R.; Ha, G.; Hoff, A.M.; Beroukhi, R.; Taplin, M.E.; Meyerson, M. Structural alterations driving castration-resistant prostate cancer revealed by linked read genome sequencing. *Cell* 2018, 174, 433-447.
- [206] Munck. A.F.; Rosenschöld, P.; Engelholm, S.; Ohlhues, L.; Law, I.; Vogelius, I.; Engelholm, S.A. Photon and proton therapy planning comparison for malignant glioma based on CT, FDG-PET, DTI-MRI and fiber tracking. *Acta Oncol.* 2011, 50(6), 777-83.
- [207] Feldman, I. Ionic strength dependence of glucose binding by yeast hexokinase isoenzymes. *Biochem. J.* 1984, 217(1), 335-337.
- [208] Pavan, B.; Dalpiaz, A.; Ciliberti, N.; Biondi, C.; Manfredini, S.; Vertuani, S. Progress in drug delivery to the central nervous system by the prodrug approach. *Molecules* 2008, 13, 1035-1065.
- [209] Olendorf, W.H.; Hyman, S.; Braun, L.; Olendorf, S.Z. Blood-brain barrier: penetration of morphine, codeine, heroin, and methadone after carotid injection. *Science* 1972, 178, 984-6.
- [210] Diamond, J.M.; Wright, E.M. Molecular forces governing non-electrolyte permeation through cell membranes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1969, 171, 273-316.
- [211] Greig, N.H.; Daly, E.M.; Sweeney, D.J., Rapoport, S.I. Pharmacokinetics of chlorambucil-tertiary butyl ester, a lipophilic chlorambucil derivative that achieves and maintains high concentrations in brain. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1990, 25, 320-5.
- [212] <https://braintumor.org/assets/docs/advanced-research/integrated-initiatives/art/anti-glycolysis-charles-conrad-overview-presentation-mdacc.pdf>
- [213] Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248-254.
- [214] Gyamfi, J.; Kim, J.; Choi, J. Cancer as a Metabolic Disorder. *Int. J. of Mol. Sci.* 2022, 23(3), 1155.
- [215] Ward, P. S.; Cross, J. R.; Lu, C.; Weigert, O.; Abel-Wahab, O.; Levine, R. L.; Weinstock, D. M.; Sharp, K. A.; Thompson, C. B. Identification of additional IDH mutations associated with oncometabolite R(-)-2-hydroxyglutarate production. *Oncogene* 2012, 31(19), 2491-2498.

- [216] Chowdhury, R.; Yeoh, K.K.; Tian, Y.M.; Hillringhaus, L.; Bagg, E.A.; Rose, N.R.; Leung, I.K.H.; Li, X.S.; Woon, E.C.Y.; Yang, M. The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases. *EMBO Rep.* 2011, 12, 463–469.
- [217] Yang, M.; Soga, T.; Pollard, P.J. Oncometabolites: Linking altered metabolism with cancer. *J. Clin. Investig.* 2013, 123, 3652–3658.
- [218] Fan, J.; Kamphorst, J.J.; Mathew, R.; Chung, M.K.; White, E.; Shlomi, T.; Rabinowitz, J.D. Glutamine-driven oxidative phosphorylation is a major ATP source in transformed mammalian cells in both normoxia and hypoxia. *Mol. Syst. Biol.* 2013, 9, 712.
- [219] Stine, Z. E.; Schug, Z. T.; Salvino, J. M.; Dang, C. V. Targeting cancer metabolism in the era of precision oncology. *Nature reviews. Drug discovery* 2022, 21(2), 141–162.
- [220] Sborov, D. W.; Haverkos, B. M.; Harris, P. J. Investigational cancer drugs targeting cell metabolism in clinical development. *Expert opinion on investigational drugs* 2015, 24(1), 79–94.
- [221] Wang, H. Y.; Tang, K.; Liang, T. Y.; Zhang, W. Z.; Li, J. Y.; Wang, W.; Hu, H. M.; Li, M. Y.; Wang, H. Q.; He, X. Z.; Zhu, Z. Y.; Liu, Y. W.; Zhang, S. Z. The comparison of clinical and biological characteristics between IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *J. of Exp. & Clinic. Cancer Res.: CR*, 2016, 35, 86.
- [222] Popovici-Muller, J.; Lemieux, R.M.; Artin, E.; Saunders, J.O.; Salituro, F.G.; Travins, J.; Cianchetta, G.; Cai, Z.; Zhou, D.; Cui, D.; Chen, P.; Straley, K.; Tobin, E.; Wang, F.; David, M.D.; Penard-Lacronique, V.; Quivoron, C.; Saada, V.; de Botton, S.; Gross, S.; Dang, L.; Yang, H.; Utley, L.; Chen, Y.; Kim, H.; Jin, S.; Gu, Z.; Yao, G.; Luo, Z.; Lv, X.; Fang, C.; Yan, L.; Olaharski, A.; Silverman, L.; Biller, S.; Su, S.M.; Yen, K.; Discovery of AG-120 (Ivosidenib): A First-in-Class Mutant IDH1 Inhibitor for the Treatment of IDH1 Mutant Cancers. *ACS Med Chem Lett.* 2018, 9(4), 300-305.
- [223] Yen, K.; Travins, J.; Wang, F.; David, M.D.; Artin, E.; Straley, K.; Padyana, A.; Gross, S.; DeLaBarre, B.; Tobin, E.; Chen, Y.; Nagaraja, R.; Choe, S.; Jin, L.; Konteatis, Z.; Cianchetta, G.; Saunders, J.O.; Salituro, F.G.; Quivoron, C.; Opolon, P.; Bawa, O.; Saada, V.; Paci, A.; Broutin, S.; Bernard, O.A.; de Botton, S.; Marteyn, B.S.; Pilichowska, M.; Xu, Y.; Fang, C.; Jiang, F.; Wei, W.; Jin, S.; Silverman, L.; Liu, W.; Yang, H.; Dang, L.; Dorsch, M.; Penard-Lacronique, V.; Biller, S.A.; Su, S.M.; AG-221, a First-in-Class Therapy Targeting Acute Myeloid Leukemia Harboring Oncogenic *IDH2* Mutations. *Cancer Discov.* 2017, 7(5), 478-493.
- [224] Dang, L.; White, D. W.; Gross, S.; Bennett, B. D.; Bittinger, M. A.; Driggers, E. M.; Fantin, V. R.; Jang, H. G.; Jin, S.; Keenan, M. C.; Marks, K. M.; Prins, R. M.; Ward, P. S.; Yen,

K. E.; Liau, L. M.; Rabinowitz, J. D.; Cantley, L. C.; Thompson, C. B.; Vander Heiden, M. G.; Su, S. M. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 2009, 462(7274), 739–744.

[225] Brooks, N.; DeWalt, R.; Boulet, S.; Lu, Z.; Kays, L.; Cavitt, R.; Gomez, S.; Strelow, J.; Milligan, P.; Roth, K.; Bauer, R.; Antonysamy, S.; Hahn, P.; Rankovic, Z.; McCann, D.; Mo, G.; Tiu, R.; Burkholder, T.; Geeganage, S.; Gilmour, R. Identification and characterization of LY3410738, a novel covalent inhibitor of cancer-associated mutant isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1). *Cancer Res.* 2019, 79, 13.

[226] Nakagawa, M.; Nakatani, F.; Matsunaga, H.; Seki, T.; Endo, M.; Ogawara, Y.; Machida, Y.; Katsumoto, T.; Yamagata, K.; Hattori, A.; Fujita, S.; Aikawa, Y.; Ishikawa, T.; Soga, T.; Kawai, A.; Chuman, H.; Yokoyama, N.; Fukushima, S.; Yahiro, K.; Kimura, A.; Shimada, E.; Hirose, T.; Fujiwara, T.; Setsu, N.; Matsumoto, Y.; Iwamoto, Y.; Nakashima, Y.; Kitabayashi, I. Selective inhibition of mutant IDH1 by DS-1001b ameliorates aberrant histone modifications and impairs tumor activity in chondrosarcoma. *Oncogene.* 2019, 38(42), 6835-6849.

[227] Caravella, J.A.; Lin, J.; Diebold, R.B.; Campbell, A.M.; Ericsson, A.; Gustafson, G.; Wang, Z.; Castro, J.; Clarke, A.; Gotur, D.; Josephine, H.R.; Katz, M.; Kershaw, M.; Yao, L.; Toms, A.V.; Barr, K.J.; Dinsmore, C.J.; Walker, D.; Ashwell, S.; Lu, W. Structure-Based Design and Identification of FT-2102 (Olutasidenib), a Potent Mutant-Selective IDH1 Inhibitor. *J. Med. Chem.* 2020, 63(4), 1612-1623.

[228] Konteatis, Z.; Artin, E.; Nicolay, B.; Straley, K.; Padyana, A.K.; Jin, L.; Chen, Y.; Narayaraswamy, R.; Tong, S.; Wang, F.; Zhou, .,; Cui, D.; Cai, Z.; Luo, Z.; Fang, C.; Tang, H.; Lv, X.; Nagaraja, R.; Yang, H.; Su, S.M.; Sui, Z.; Dang, L.; Yen, K.; Popovici-Muller, J.; Codega, P.; Campos, C.; Mellinghoff, I.K.; Biller, S.A. Vorasidenib (AG-881): A First-in-Class, Brain-Penetrant Dual Inhibitor of Mutant IDH1 and 2 for Treatment of Glioma. *ACS Med. Chem. Lett.* 2020, 22, 11(2), 101-107.

[229] Lemberg, K.; Gor, S.; Tsukamoto, T.; Rais, R.; Slusher, B.S. Clinical development of metabolic inhibitors for oncology. *J. Clin. Invest.* 2022, 132(1), e148550.

[230] Rai, G.; Urban, D. J.; Mott, B. T.; Hu, X.; Yang, S. M.; Benavides, G. A.; Johnson, M. S.; Squadrito, G. L.; Brimacombe, K. R.; Lee, T. D.; Cheff, D. M.; Zhu, H.; Henderson, M. J.; Pohida, K.; Sulikowski, G. A.; Dranow, D. M.; Kabir, M.; Shah, P.; Padilha, E.; Tao, D. Maloney, D. J. Pyrazole-based lactate dehydrogenase inhibitors with optimized cell activity and pharmacokinetic properties. *J. Med. Chem.* 2020, 63, 10984–11011.

[231] Xie, H.; Hanai, J.; Ren, J. G.; Kats, L.; Burgess, K.; Bhargava, P.; Signoretti, S.; Billiard, J.; Duffy, K. J.; Grant, A.; Wang, X.; Lorkiewicz, P. K.; Schatzman, S.; Bousamra, M.; Lane,

- A. N.; Higashi, R. M.; Fan, T. W.; Pandolfi, P. P.; Sukhatme, V. P.; Seth, P.. Targeting lactate dehydrogenase-a inhibits tumorigenesis and tumor progression in mouse models of lung cancer and impacts tumor-initiating cells. *Cell Metab.* 2014, 19, 795–809.
- [232] Chan, D. A.; Sutphin, P. D.; Nguyen, P.; Turcotte, S.; Lai, E. W.; Banh, A.; Reynolds, G. E.; Chi, J. T.; Wu, J.; Solow-Cordero, D. E.; Bonnet, M.; Flanagan, J. U.; Bouley, D. M.; Graves, E. E.; Denny, W. A.; Hay, M. P.; Giaccia, A. J. Targeting GLUT1 and the Warburg effect in renal cell carcinoma by chemical synthetic lethality. *Sci. Trans. Med.* 2011, 3(94), 94ra70.
- [233] Wu, Q.; Ba-alawi, W.; Deblois, G.; Cruickshank, J.; Duan, S.; Lima-Fernandes, E.; Haight, J.; Tonekaboni, S.A.; Fortier, A.; Kuasne, H.; McKee, T.; Mahmoud, H.; Kushida, M.; Cameron, S.; Dogan-Artun, N.; Chen, W.; Nie, Y.; Zhang, L.X.; Zhou, S.; Prinos, P.; Wouters, B.; Dirks, P.; Done, S.J., Par, M.; Cescon, D.; Haibe-Kains, B.; Lupien, M.; Arrowsmith, C.H. GLUT1 inhibition blocks growth of RB1-positive triple negative breast cancer. *Nat. Commun.* 2020, 11, 4205.
- [234] Rastogi, S.; Banerjee, S.; Chellappan, S.; Simon, G.R. Glut-1 antibodies induce growth arrest and apoptosis in human cancer cell lines. *Cancer Lett.* 2007, 257, 244–251.
- [235] Kapoor, K.; Finer-Moore, J.S.; Pedersen, B.P. Mechanism of inhibition of human glucose transporter GLUT1 is conserved between cytochalasin B and phenylalanine amides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2016, 113, 4711–4716.
- [236] Suzuki, A.; Puri, S.; Leland, P.; Puri, A.; Moudgil, T.; Fox, B. A.; Puri, R. K.; Joshi, B. H. Subcellular compartmentalization of PKM2 identifies anti-PKM2 therapy response in vitro and in vivo mouse model of human non-small-cell lung cancer. *PloS One* 2019, 14(5), e0217131.
- [237] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00540176>
- [238] Dunbar, E.; M., Coats, B. S.; Shroads, A. L.; Langae, T.; Lew, A.; Forder, J. R.; Shuster, J. J.; Wagner, D. A.; Stacpoole, P. W. Phase 1 trial of dichloroacetate (DCA) in adults with recurrent malignant brain tumors. *Invest. New Drugs* 2014, 32(3), 452–464
- [239] Farhadi, P.; Yarani, R.; Dokaneheifard, S.; Mansouri, K. The emerging role of targeting cancer metabolism for cancer therapy. *Tumour Biol.* 2020, 42(10), 1010428320965284.
- [240] Patra, K. C. Wang, Q.; Bhaskar, P. T.; Miller, L.; Wang, Z.; Wheaton, W.; Chandel, N.; Laakso, M.; Muller, W. J.; Allen, E. L.; Jha, A. K.; Smolen, G. A.; Clasquin, M. F.; Robey, B.; Hay, N. Hexokinase 2 is required for tumor initiation and maintenance and its systemic deletion is therapeutic in mouse models of cancer. *Cancer Cell* 2013, 24, 213–228.

- [241] Hein, M. Y.; Hubner, N. C.; Poser, I.; Cox, J.; Nagaraj, N.; Toyoda, Y.; Gak, I. A.; Weisswange, I.; Mansfeld, J.; Buchholz, F.; Hyman, A. A.; Mann, M. A human interactome in three quantitative dimensions organized by stoichiometries and abundances. *Cell* 2015, 163(3), 712–723.
- [242] Fan, T., Sun, G., Sun, X., Zhao, L., Zhong, R., & Peng, Y. Tumor Energy Metabolism and Potential of 3-Bromopyruvate as an Inhibitor of Aerobic Glycolysis: Implications in Tumor Treatment. *Cancers* 2019, 11(3), 317.
- [243] Chang J.M.; Chung J.W.; Jae H.J.; Eh H., Son K.R.; Lee K.C.; Park J.H. Local toxicity of hepatic arterial infusion of hexokinase II inhibitor, 3-bromopyruvate: In vivo investigation in normal rabbit model. *Acad. Radiol.* 2007, 14, 85–92.
- [244] Oudard, S., Carpentier, A., Banu, E. *et al.* Phase II Study of Lonidamine and Diazepam in the Treatment of Recurrent Glioblastoma Multiforme. *J Neurooncol* 2003, 63, 81–86.
- [245] Liu, Y.; Li, M.; Zhang, Y.; Wu, C.; Yang, K.; Gao, S.; Zheng, M.; Li, X.; Li, H.; Chen, L.; Structure based discovery of novel hexokinase 2 inhibitors. *Bioorg. Chem.* 2020, 96,103609
- [246] Dai, W.; Wang, F.; Lu, J.; Xia, Y.; He, L.; Chen, K.; Li, J.; Li, S.; Liu, T.; Zheng, Y.; Wang, J.; Lu, W.; Zhou, Y.; Yin, Q.; Abudumijiti, H.; Chen, R.; Zhang, R.; Zhou, L.; Zhou, Z.; Zhu, R Guo, C. (2015). By reducing hexokinase 2, resveratrol induces apoptosis in HCC cells addicted to aerobic glycolysis and inhibits tumor growth in mice. *Oncotarget* 2015, 6(15), 13703–13717.
- [247] Tao, L.; Wei, L.; Liu, Y.; Ding, Y.; Liu, X.; Zhang, X.; Wang, X.; Yao Y.; Lu, J.; Wang, Q.;Hu, R. Gen-27, a newly synthesized flavonoid, inhibits glycolysis and induces cell apoptosis via suppression of hexokinase II in human breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 2017, 125, 12–25.
- [248] Schmidt, M. C.; O'Donnell, A. F. 'Sugarcoating' 2-deoxyglucose: mechanisms that suppress its toxic effects. *Current genetics* 2021, 67(1), 107–114.
- [249] Zhang, X. D.; Deslandes, E.; Villedieu, M.; Poulain, L.; Duval, M.; Gauduchon, P.; Schwartz, L.; Icard, P. Effect of 2-deoxy-D-glucose on various malignant cell lines in vitro. *Anticancer Res.* 2006, 26(5A), 3561–3566.
- [250] Hellemann, E., Walker, J. L., Lesko, M. A., Chandrashekarappa, D. G., Schmidt, M. C., O'Donnell, A. F., & Durrant, J. D. Novel mutation in hexokinase 2 confers resistance to 2-deoxyglucose by altering protein dynamics. *PLoS Comp. Biol.* 2022, 18(3), e1009929.
- [251] Rossi, D. C.; Figueroa, J.; Buesing, W. R.; Candor, K.; Blancett, L. T.; Evans, H. M.; Lenchitz, R.; Crowther, B. L.; Elsegeiny, W.; Williamson, P. R.; Rupp, J.; Deepe, G. S. A

metabolic inhibitor arms macrophages to kill intracellular fungal pathogens by manipulating zinc homeostasis. *The J. of Clinic. Investig.* 2021, 131(16), e147268

[252] Sahu, K.K.; Kumar, R. Role of 2-Deoxy-D-Glucose (2-DG) in COVID-19 disease: A potential game-changer. *J. Family Med. Prim. Care.* 2021, 10(10), 3548-3552

[253] Huang, Z.; Chavda, V. P.; Vora, L. K.; Gajjar, N.; Apostolopoulos, V.; Shah, N.; Chen, Z. S. 2-Deoxy-D-Glucose and its Derivatives for the COVID-19 Treatment: An Update. *Frontiers in pharmacology* 2022, 13, 899633.

[254] Leung, H. J.; Duran, E. M.; Kurtoglu, M.; Andreansky, S.; Lampidis, T. J.; Activation of the unfolded protein response by 2-deoxy-Dglucose inhibits kaposi's sarcoma-associated herpesvirus replication and gene expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012. 56, 5794–5803

[255] Jain, V.K.; Kalia, V.K.; Sharma, R.; Maharajan, V.; Menon M. Effects of 2-Deoxy-D-glucose on glycolysis, proliferation kinetics and radiation response of human cancer cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1985, 11, 943–950.

[256] Priebe, W.; Madden, T.; Charles, C.; Ji ,Y.; Hsu, S.; Fokt, I.; Lang, F.; 2-Deoxy-D-glucose: Old molecule, new brain tumor agent inducing autophagy. *Cancer Res.* 2007, 67, 4863.

[257] Liu, H. Hu, Y.P.; Savaraj, N. Priebe, W.; Lampidis, T.J. Hypersensitization of tumor cells to glycolytic inhibitors. *Biochem.* 2001, 40, 5542–5547.

[258] Liu, H.; Savaraj, N.; Priebe, W.; Lampidis, T.J. Hypoxia increases tumor cell sensitivity to glycolytic inhibitors a strategy for solid tumor therapy (Model C). *Biochem. Pharmacol.* 2002, 64, 1746–1751.

[259] Maher, J.C.; Krishan, A.; Lampidis, T.J. Greater cell cycle inhibition and cytotoxicity induced by 2-deoxy-D-glucose in tumor cells treated under hypoxic versus aerobic conditions. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2004, 53, 116–122

[260] Sun X.; Fan, T.; Sun, G.; Zhou, Y.; Huang, Y.; Zhang, Na.; Zhao, L.; Zhong, R.; Peng, Y.; 2-Deoxy-D-glucose increases the sensitivity of glioblastoma cells to BCNU through the regulation of glycolysis, ROS and ERS pathways: In vitro and in vivo validation. *Biochem. Pharmacol.* 2022, 199, 115029

[261] Mohanti, B. K.; Rath, G. K.; Anantha, N.; Kannan, V.; Das, B. S.; Chandramouli, B.; Banerjee, A. K.; Das, S.; Jena, A.; Ravichandran, R.; Sahi, U. P.; Kumar, R.; Kapoor, N.; Kalia, V. K.; Dwarkanath, B. S.; Jain, V. Improving cancer radiotherapy with 2-deoxy-D-glucose: phase I/II clinical trials on human cerebral gliomas. *Int. J. of Rad. Oncol. Biol. Physics* 1996, 35(1), 103–111.

- [262] Venkataramana, N.K.; Prasanna, K.V.; Vishwanath, P.N. Enhanced radiation effect on the tumor with protection of normal brain during a combinational therapy of 2-deoxy-d-glucose and hypo fractionated radiotherapy in malignant gliomas. Presented at: International Symposium on Application of 2-Deoxy-d-Glucose in the Management of Cancer. *INMAS* 2006, 8 (10).
- [263] Bessel, E.M.; Foster, A.B.; Westwood, J.H. The use of deoxyfluoro-D-glucopyranoses and related compounds in a study of yeast hexokinase specificity. *Biochem J.* 1972, 128, 199-204
- [264] Som, P.; Atkins, H. L.; Bandoypadhyay, D.; Fowler, J. S.; MacGregor, R. R.; Matsui, K.; Oster, Z. H.; Sacker, D. F.; Shiue, C. Y.; Turner, H.; Wan, C. N.; Wolf, A. P.; Zabinski, S. V. A fluorinated glucose analog, 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (F- 18): nontoxic tracer for rapid tumor detection. *J. NucZ. Med.* 1980, 21, 670-675.
- [265] Juweid, M.E.; Cheson, B.D. Positron-emission tomography and assessment of cancer therapy. *N. Engl. J. Med.* 2006, 354, 496–507.
- [266] Storto, G.; Nicolai, E.; Salvatore, M. [18F]FDG-PET-CT for early monitoring of tumor response: when and why. *Q J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2009, 53, 167–180.
- [267] Lampidis, T. J., Kurtoglu, M., Maher, J. C., Liu, H., Krishan, A., Sheft, V., Szymanski, S., Fokt, I., Rudnicki, W. R., Ginalski, K., Lesyng, B., & Priebe, W. (2006). Efficacy of 2-halogen substituted D-glucose analogs in blocking glycolysis and killing "hypoxic tumor cells". *Cancer Chemother. Pharmacol.* 58(6), 725–734.
- [268] Morgenthaler, M.; Schweizer, E.; Hoffmann-Röder, A.; Benini, F.; Martin, R.E.; Jaeschke, G.; Wagner, B.; Fischer, H.; Bendels, S.; Zimmerli, D.; Predicting and Tuning Physicochemical Properties in Lead Optimization: Amine Basicities. *Chem. Med. Chem.* 2007, 2, 1100–1115.
- [269] Rowley, M.; Hallett, D.J.; Goodacre, S.; Moyes, C.; Crawforth, J.; Sparey, T.J.; Patel, S.; Marwood, R.; Patel, S.; Thomas, S. 3-(4-Fluoropiperidin-3-Yl)-2-Phenylindoles as High Affinity, Selective, and Orally Bioavailable H5-HT_{2A} Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* 2001, 44, 1603–1614.
- [270] Antonovic, L.; Fokt I., Szymanski, S.; Conrad, C.; Johansen, M.; Madden, T.; Priebe, W. 2-Deoxy-2-fluoro-D-mannose induces type II cell death in gliomas. *Cancer Res.* 2008, 68, 3359.
- [271] patent Priebe i wsp. US2010/0130434 A1

- [272] Yu, Y.; Liu, A.; Dhawan, G.; Mei, H.; Zhang, W.; Izawa, K.; Soloshonok, V.A.; Han, J. Fluorine-Containing Pharmaceuticals Approved by the FDA in 2020. Synthesis and Biological Activity. *Chin. Chem. Lett.* 2021, 32, 3342–3354.
- [273] Inoue, M., Sumii, Y., Shibata, N. Contribution of Organofluorine Compounds to Pharmaceuticals. *ACS Omega.* 2020, 5, 10633–10640.
- [274] Benedetto, Tiz.; D., Bagnoli, L.; Rosati, O.; Marini, F.; Sancineto, L.; Santi, C. (2022). New Halogen-Containing Drugs Approved by FDA in 2021: An Overview on Their Syntheses and Pharmaceutical Use. *Molecules* 2022, 27(5), 1643.
- [275] Fang, W.Y.; Ravindar, L.; Rakesh, K.P.; Manukumar, H.M.; Shantharam, C.S.; Alharbi N.S.; Qin, H.L. Synthetic Approaches and Pharmaceutical Applications of Chloro-Containing Molecules for Drug Discovery: A Critical Review. *Eur. J. Med. Chem.* 2019, 173, 117–153.
- [276] Hernandes, M.Z.; Cavalcanti, S.M.T.; Moreira, D.R.M.; Junior, W.F.d.A.; Leite, A.C.L. Halogen Atoms in the Modern Medicinal Chemistry: Hints for the Drug Design. *Curr. Drug Targets.* 2010, 11, 303–314.
- [277] Vega-Riveroll, L.J.; Mondragón, P.; Rojas-Aguirre, J.; Delgado, G.; González-Cedillo, F.J.; Romero-Romo, J.I.; Hernández-Pando, R.; Aceves, C. Abstract P6-14-15: Impaired Nuclear Translocation of Estrogen Receptor Alfa Could Be Associated with the Antineoplastic Effect of Iodine in Premenopausal Breast Cancer. *Cancer Res.* 2010, Annual San Antonio Breast Cancer Symposium.
- [278] Aceves, C.; Anguiano, B.; Delgado, G. The extrathyronine actions of iodine as antioxidant, apoptotic, and differentiation factor in various tissues. *Thyroid.* 2013, 23, 938-46.
- [279] Deneff, J. F.; Many, M. C.; van den Hove, M. F. Iodine-induced thyroid inhibition and cell necrosis: two consequences of the same free-radical mediated mechanism. *Mol. Cell. Endocr.* 1996, 121(1), 101–103
- [280] patent Priebe i wsp., US 8,299,033 B2, 2012
- [281] Priebe, W.; Zielinski, R.; Fokt, I.; Felix, E.; Venugopal, R.; Arumugam, J.; Khuong, M.; Krasinski, M.; Skora, S. EXTH-07. Design and evaluation of WP1122, an inhibitor of glycolysis with increased CNS uptake. *Neuro-Oncology* 2018, 20, 86-86.
- [282] Diao, W.; Tong, X.; Yang, C.; Zhang, F.; Bao, C.; Chen, H.; Liu, L.; Ye, F.; Fan, Q.; Wang, J.; Ou-Yang, Z. Behaviors of Glioblastoma Cells in *in Vitro* Microenvironments. *Sci. Rep.* 2019, 9, 85.
- [283] Zakaria, Z.; Tivnan, A.; Flanagan, L.; Murray, D. W.; Salvucci, M.; Stringer, B. W.; Day, B. W.; Boyd, A. W.; Kögel, D.; Rehm, M.; O'Brien, D. F.; Byrne, A. T.; Prehn, J. H. Patient-

derived glioblastoma cells show significant heterogeneity in treatment responses to the inhibitor-of-apoptosis-protein antagonist birinapant. *Brit. J. Cancer* 2016, 114(2), 188–198.

[284] Li, H.; Lei, B.; Xiang, W.; Wang, H.; Feng, W.; Liu, Y.; Qi, S. Differences in Protein Expression between the U251 and U87 Cell Lines. *Turk. Neurosurg.* 2017, 27(6), 894–903.

[285] Macintosh, R.; Ryan, K. Autophagy in tumor cell death. *Semin. Cancer Biol.* 2013, 23, 34351

[286] Karbowski, M.; Lee, Y.J.; Gaume, B.; Jeong, S.Y.; Frank, S.; Nechushtan, A.; Santel, A.; Fuller, M.; Smith, C.L.; Youle, R.J. Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J. Cell Biol.* 2002, 159, 931-938.

[287] Shiratori, R.; Furuichi, K.; Yamaguchi, M.; Miyazaki, N.; Aoki, H.; Chibana, H.; Ito, K.; Aoki, S. Glycolytic suppression dramatically changes the intracellular metabolic profile of multiple cancer cell lines in a mitochondrial metabolism-dependent manner. *Sci. Rep.* 2019, 9(1), 18699.

Wykaz Rycin

Rycina 1. Niejednorodność zmian anatomicznych glejaka wielopostaciowego.	18
Rycina 2. Porównanie metabolizmu glukozy w komórkach zróżnicowanych oraz komórkach nowotworowych.	22
Rycina 3. Regulacja genów przez kompleks ARNT/HIF-1 β /HIF-1 α w komórkach ssaków w warunkach normoksji i hipoksji.	23
Rycina 4. Związki hamujące aktywność transporterów glukozy lub enzymów szlaku glikolizy.	27
Rycina 5. Porównanie struktury chemicznej D-glukozy i 2-deoksy-D-glukozy.	28
Rycina 6. Schemat metabolizmu glukozy oraz 2-DG w komórce nowotworowej.	29
Rycina 7. Molekularne ścieżki indukcji autofagii przez 2-DG.	32
Rycina 8. Schematyczna ilustracja procesów komórkowych indukowanych w warunkach niedoboru glukozy.	36
Rycina 9. Wychwył 2- ¹⁸ FG przez guz w PET pacjenta chorego na GBM.	40
Rycina 10. Acetylacja 2-DG w pozycji C3 i C6.	42
Rycina 11. Struktury chemiczne A) 2-DG i WP1122, B) 2-CG, 2-CM, 2-BG i 2-BM, C) 2-FG, 2-FM, 2,2-diFG, D) 2-IG i 2-IM.	47
Rycina 12. Żywotność komórek linii U-251 i U-87 oznaczona za pomocą testu MTS po 72 h inkubacji z różnymi stężeniami pochodnych 2-DG.	64
Rycina 13. Żywotność komórek linii U-251 oraz U-87 traktowanych DMOG i/lub rodaminą 123.	68
Rycina 14. Analiza Western blot poziomu ekspresji białek HIF-1 α , PDK1 oraz LDHA pod wpływem inkubacji z DMOG [50 lub 100 μ M] i/lub Rho-123 [0,25 lub 0,5 μ M] (72 h).	69
Rycina 15. Żywotność komórek linii U-251 i U087 w warunkach normoksji oraz warunkach symulujących hipoksję.	70
Rycina 16. Natężenie proliferacji komórek linii U-251 i U-87 ocenione z wykorzystaniem testu BrdU.	73
Rycina 17. Ocena natężenia syntezy białek w komórkach linii U-251 i U-87 z wykorzystaniem testu z barwnikiem SRB.	76
Rycina 18. Ocena aktywacji kaspazy 3 w komórkach linii U-251 i U-87.	80
Rycina 19. Ocena natężenia syntezy kwasu mlekowego w komórkach linii U-251 i U-87	83
Rycina 20. Ocena wpływu badanych pochodnych na aktywność heksokinazy II w komórkach linii U-251 i U-87.	87

Rycina 21. Żywotność komórek linii U-251 i U-87 mierzona za pomocą testu MTS po 72 h inkubacji ze wzrastającymi stężeniami chlorochiny.	90
Rycina 22. Żywotność komórek linii U-251 i U-87 mierzona za pomocą testu MTS po 72 h inkubacji z wyznaczonymi stężeniami IC50 badanych związków bez/z CQ.	91
Rycina 23. Analiza Western blot ekspresji markera autofagii – białka MAP-LC3.	92
Rycina 24. Obraz ultrastruktury komórek.	93
Rycina 25. Plazmid rekombinacyjny pMCSG7 kodujący gen HK II.	96
Rycina 26. Rozdział elektroforetyczny insertu oraz wektora po reakcji PCR.	97
Rycina 27. Rozdział elektroforetyczny kolonii bakterii kompetentnych <i>E. coli</i> zawierających wklonowany materiał genetyczny.	97
Rycina 28. Rozdział elektroforetyczny supernatantu oraz lizatów komórkowych otrzymanych w wyniku testowania różnych warunków ekspresji HK II.	98
Rycina 29. Ekspresja HK II z plazmidu po mutagenezie we frakcji rozpuszczalnej lizatu bakteryjnego dla kilku warunków.	99
Rycina 30. Frakcje uzyskane po oczyszczaniu supernatantu za pomocą chromatografii IMAC.	99
Rycina 31. Profil elucji rozdziału SEC oczyszczonego preparatu białka HK II.	100
Rycina 32. Struktury krystaliczne badanych związków ze schamtem numeracji atomów.	102
Rycina 33. Ocena wpływu fluoropochodnych 2-DG na aktywność HK.	104
Rycina 34. Porównanie wpływu fluoro-, chloro- i bromo-pochodnych 2-DG na hamowanie aktywności ludzkiej HK II w układzie pozakomórkowym.	105
Rycina 35. Porównanie wpływu 2-DG, jodopochodnych 2-DG oraz 2,2-diFG na hamowanie aktywności ludzkiej HK II w układzie pozakomórkowym.	106
Rycina 36. Analiza wpływu dodatku 5, 10, 20 i 40 mM glukozy na zdolność hamowania aktywności HK II przez 2,2-diFG [5 mM].	106

Wykaz Tabel

Tabela 1. Zastosowanie 2-DG w terapii skojarzonej – przykłady badań przedklinicznych i klinicznych	33
Tabela 2. Wartości IC ₅₀ badanych związków dla linii komórkowych U-251 oraz U-87	67