

Abstrakt

3-bromopirogronian (3-BP) jest analogiem kwasu pirogronowego o właściwościach alkilujących, który w badaniach przedklinicznych wykazuje obiecujące działanie przeciwnowotworowe. Pomimo wielu badań nad tym związkiem, molekularny mechanizm jego działania nie został dokładnie poznany. Najczęściej opisywanymi w literaturze naukowej efektami działania 3-BP są m.in. hamowanie enzymów glikolizy, cyklu Krebsa, oraz transportu elektronów w łańcuchu oddechowym prowadzące do wyczerpania ATP i w konsekwencji śmierci komórek. W komórkach nowotworowych dochodzi do zwiększonej ekspresji transporterów kwasów monokarboksylowych, przez które 3-BP jest transportowany do komórek, dlatego związek jest bardziej toksyczny dla komórek nowotworowych niż dla zdrowych. W celu zastosowania tego związku w potencjalnej terapii przeciwnowotworowej u ludzi konieczna jest pełna charakterystyka jego molekularnego mechanizmu działania. Należy podkreślić, że do tej pory nie przeprowadzono badań genotoksyczności 3-BP, dlatego przeprowadzono wnikliwą analizę wpływu 3-BP na genom jądrowy i mitochondrialny. Wyniki tej analizy przedstawione są w niniejszej rozprawie doktorskiej. Badania przeprowadzono na jednokomórkowym, eukariotycznym organizmie modelowym jakim są drożdże piekarnicze *Saccharomyces cerevisiae*. Wykazano, że w wyniku działania 3-BP dochodzi do aktywacji punktów kontrolnych cyklu komórkowego w odpowiedzi na uszkodzenia DNA oraz powstawania złamań DNA w genomie jądrowym i mitochondrialnym. Obecność uszkodzeń DNA w wyniku inkubacji z 3-BP została również potwierdzona w komórkach ludzkiej linii nowotworowej THP-1. Udowodniono, że w komórkach drożdży piekarniczych w odpowiedzi na 3-BP uruchamiana jest ścieżka naprawy DNA na drodze homologicznej rekombinacji. Ponadto zaobserwowano, że inkubacja komórek drożdży piekarniczych w obecności 3-BP prowadzi do indukcji stresu oksydacyjnego, którego źródłem mogą być mitochondria. Wykazano, że funkcjonalne mitochondria z nienaruszonym mitochondrialnym genomem są niezbędne komórkom drożdży piekarniczych do przeżycia w obecności 3-BP, a pod wpływem działania związku dochodzi do powstawania uszkodzeń w mitochondrialnym DNA. Ważnym odkryciem było udowodnienie, że 3-BP działa synergistycznie ze związkami wywołującymi stres oksydacyjny i zaburzającymi transport elektronów w łańcuchu oddechowym komórek drożdży piekarniczych. Co więcej, w komórkach ludzkich linii nowotworowych zaobserwowano podobny efekt synergistyczny między 3-BP i fenforminą, która jest inhibitorem enzymów łańcucha oddechowego. Przedstawione w pracy wyniki dodatkowo sugerują, że 3-BP może uszkadzać zarówno

DNA jądrowy jak i mitochondrialny. To częściowo wyjaśnia mechanizm i aktywność biologiczną tego związku na poziomie molekularnym. Natomiast wykazany efekt synergizmu 3-bromopirogronianu z fenforminą może mieć pewien aspekt praktyczny – aplikacyjny ponieważ stanowi podstawę do opracowania bardziej efektywnej terapii w leczeniu onkologicznym ludzi.

Abstract

3-Bromopyruvate (3-BP) is an analog of pyruvic acid displaying alkylating properties. Its promising anticancer activity in preclinical studies has been demonstrated globally. Despite extensive research, additional mechanisms of its cellular activities continue to be discovered. The most commonly reported mechanisms of 3BP's actions include inhibition of glycolysis, the Krebs cycle, and the electron transport respiratory chain enzymes leading to ATP depletion and cell death. Cancer cells overexpress monocarboxylic acid transporters through which 3-BP is transported selectively into cancer cells, leading to its accumulation in neoplastic cells. To use 3-BP in human therapy it is important to characterize its cellular actions' mechanisms fully. To date, no studies have reported the effect of 3-BP on genomes stability and genotoxicity. For this reason, the impact of 3-BP on the nuclear and mitochondrial genome was analyzed, and the results are presented in this paper. Using the model organism of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, we have shown that 3-BP treatment resulted in the activation of DNA damage checkpoint and led to the formation of DNA breaks. DNA damage after 3-BP treatment has also been confirmed in the human cancer line THP-1. Results suggest that the homologous repair pathway is activated in response to 3-BP in baker's yeast cells. Additionally, it has been observed that incubating baker's yeast cells with 3BP leads to oxidative stress, which might be caused by inhibiting the mitochondrial electron transport chain. We demonstrated that 3-BP could lead to mitochondrial DNA damage, and functional mitochondria containing intact mitochondrial DNA are necessary for survival in the presence of 3-BP. It was discovered that 3-BP acts synergistically with molecules that induce oxidative stress and disrupt the electron transport of respiratory chain in baker's yeast cells. Moreover, a similar synergistic anticancer effect was observed with the combination of 3-BP and phenformin, an electron transport chain inhibitor, in human cancer cell lines. The results presented in the current thesis suggest that 3-BP can damage nuclear and mitochondrial DNA, demonstrating an additional mechanism of 3-BP's action. In addition, the presented

synergism of 3BP with phenformin may contribute to the design of more effective anticancer therapies.

12-05-2023

Grwin Motyjaszyczk