

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Nives ŠKORJA

**VPLIV METFORMINA NA MITOHONDRIJSKI  
POTENCIAL IN PRESNOVO LAKTATA V CELICAH  
RAKA DOJKE**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Nives ŠKORJA

**VPLIV METFORMINA NA MITOHONDRIJSKI POTENCIAL IN  
PRESNOVO LAKTATA V CELICAH RAKA DOJKE**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja

**EFFECT OF METFORMIN ON MITOCHONDRIAL POTENTIAL  
AND LACTATE PRODUCTION IN BREAST CANCER CELLS**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. bolonjske stopnje - Molekulska in funkcionalna biologija. Magistrsko delo je bilo opravljeno v okviru projekta ARRS J3-6794 in raziskovalnega programa P3-0043 v Laboratoriju za molekularno nevrobiologijo na Inštitutu za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani in v laboratoriju Skupine za nano in biotehnološke aplikacije, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani. Raziskave ter analize vzorcev s pretočnim citometrom so bile opravljene na Kemijskem Inštitutu.

Po sklepu študijske komisije Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete je bil dne 20.2.2015 za mentorja magistrskega dela imenovan doc. dr. Sergej Pirkmajer, za recenzenta pa prof. dr. Marko Kreft.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Tom TURK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Sergej PIRKMAJER

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo

Član: prof. dr. Marko KREFT

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je magistrsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Nives Škorja

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

- ŠD Du2
- DK UDK 618.19-006(043.2)=163.6
- KG metabolizem rakavih celic/metformin/celice raka dojke/mitohondrijski potencial/nastanek laktata
- AV ŠKORJA, Nives, dipl. biol. (UN)
- SA PIRKMAJER, Sergej (mentor)/KREFT Marko (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij molekulske in funkcionalne biologije
- LI 2016
- IN VPLIV METFORMINA NA MITOHONDRIJSKI POTENCIAL IN PRESNOVO LAKTATA V CELICAH RAKA DOJKE
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
- OP XIII, 70 str., 6 pregl., 19 sl., 92 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Za protirakav vpliv metformina na celično linijo raka dojke MDA-MB-231 je med rezultati obstoječih študij precej neskladij. Cilj magistrske naloge je bil opredeliti učinke metformina na energijsko presnovo celic raka dojke in primerjava s celicami raka prostate PC-3. Z uporabo barvila TMRM in kolorimetričnega testa za meritev aktivnosti fumaraze smo zaznali upad mitohondrijskega membranskega potenciala in aktivnosti fumaraze v celicah raka dojke, s čemer smo dokazali vpliv metformina na dihalno verigo in Krebsov cikel. Z encimskim testom za določanje koncentracije laktata v mediju smo zaznali povečano nastajanje laktata in posredno potrdili, da metformin spodbuja aerobno glikolizo v obeh celičnih linijah. To bi lahko bila posledica inhibicije mitohondrijev z metforminom, zaradi katere je pridobivanje ATP z oksidativno fosforilacijo zavrto in zato celice potrebujejo več ATP iz glikolize. Lahko pa bi bila spodbujena glikoliza povezana z aktivacijo z AMP-aktivirane protein kinaze (AMPK) zaradi energijskega stresa, ki smo ga dokazali z uporabo prenosa western. S to metodo smo potrdili, da metformin preprečuje stabilizacijo HIF-1 $\alpha$  inducirane s kemično hipoksijo v celicah raka dojke. Z uporabo barvila Hoechst smo pokazali, da metformin ni imel bistvenega vpliva na proliferacijo celic raka dojke, njegov vpliv na celice raka prostate pa je bil odvisen od koncentracije, časa tretiranja in predvsem od koncentracije glukoze v mediju.

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

- DN Du2
- DC UDC 618.19-006(043.2)=163.6
- CX cancer cell metabolism/metformin/breast cancer cells/mitochondrial potential/lactate production
- AU ŠKORJA, Nives
- AA PIRKMAJER, Sergej (supervisor)/KREFT Marko (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study Programmes in Molecular and Functional Biology
- PY 2016
- TI EFFECT OF METFORMIN ON MITOCHONDRIAL POTENTIAL AND LACTATE PRODUCTION IN BREAST CANCER CELLS
- DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
- NO XIII, 70 p., 6 tab., 19 fig., 92 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Results of existing research studies considering anti-cancer effects of metformin on the breast cancer cell line MDA-MB-231 are inconsistent. In this work, we tested the effects of metformin on energy metabolism of MDA-MB-231 breast cancer cells and compared the results with prostate cancer cell line PC-3. Mitochondrial depolarization and attenuated fumarase activity was observed by using TMRM dye and fumarase activity colorimetric assay, demonstrating that metformin has an impact on respiratory chain and Krebs cycle. Using enzymatic lactate assay we detected increased lactate production, indirectly confirming that metformin promotes aerobic glycolysis in both cell lines. This outcome could be due to metformin-induced inhibition of oxidative formation of ATP and therefore enhanced glycolytic ATP production, or it may be associated with the activation of AMPK-signaling pathway, due to metformin-induced energy stress, which was demonstrated using Western blot. Also, using Western blot we demonstrated that metformin blunted HIF-1 $\alpha$  stabilization in breast cancer cells under chemical hypoxia. Cell proliferation was estimated with fluorescent staining with Hoechst. Metformin had no significant anti-proliferative effect on breast cancer cells, while its anti-proliferative effect on prostate cancer cells revealed to be dose- and time-dependent. Antiproliferative effect of metformin was blocked by high glucose concentrations.

**KAZALO VSEBINE**

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA</b> .....	III
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION</b> .....	IV
<b>KAZALO VSEBINE</b> .....	V
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b> .....	VIII
<b>KAZALO SLIK</b> .....	IX
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b> .....	X
<b>1 UVOD</b> .....	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA .....	1
1.2 CILJI MAGISTRSKEGA DELA .....	1
<b>2 PREGLED OBJAV</b> .....	3
2.1 RAK DOJKE.....	3
2.2 METABOLIZEM RAKAVIH CELIC.....	4
<b>2.2.1 Molekularna osnova aerobne glikolize in fenotipa rakavih celic</b> .....	6
2.2.1.1 Spremembe v izražanju in aktivnosti glikoličnih encimov .....	6
2.2.1.2 Spremembe v aktivnosti signalnih poti .....	7
<b>2.2.2 Spremembe v delovanju mitohondrijev</b> .....	12
2.2.2.1 Spremembe v mitohondrijih rakavih celic .....	13
2.2.2.2 Metabolizem glutamina in maščobnih kislin .....	14
2.3 METFORMIN IN METABOLIZEM KOT SODOBNA TARČA ZA ZDRAVLJENJE RAKA .....	14
<b>2.3.1 Metformin</b> .....	15
2.3.1.1 Celice MDA-MB-231 kot model za preučevanje raka dojke.....	19
<b>2.3.2 Usmerjeno delovanje na proces glikolize</b> .....	21
<b>3 MATERIAL IN METODE</b> .....	22
3.1 CELIČNI LINIJI MDA-MB-231 IN PC-3.....	22
<b>3.1.1 Celični liniji raka dojke in raka prostate</b> .....	22
<b>3.1.2 Gojenje</b> .....	22

<b>3.1.3</b>	<b>Presajanje</b> .....	22
<b>3.1.4</b>	<b>Shranjevanje v tekočem dušiku</b> .....	23
<b>3.1.5</b>	<b>Odmrzovanje</b> .....	23
3.2	UČINKOVINE.....	23
3.3	OPREMA .....	24
3.4	MERJENJE MITOHONDRIJSKEGA MEMBRANSKEGA POTENCIALA Z BARVILOM TMRM.....	24
3.5	MERJENJE AKTIVNOSTI FUMARAZE .....	25
3.6	DOLOČANJE KONCENTRACIJE LAKTATA.....	26
3.7	DOLOČANJE SIGNALNIH POTI AMPK-ACC IN HIF-1 $\alpha$ S PRENOSOM (ODTISOM) WESTERN.....	26
<b>3.7.1</b>	<b>Priprava vzorcev</b> .....	27
<b>3.7.2</b>	<b>Gelska elektroforeza in prenos na membrano</b> .....	28
<b>3.7.3</b>	<b>Barvanje z barvilom Ponceau S</b> .....	29
<b>3.7.4</b>	<b>Blokiranje membrane</b> .....	29
<b>3.7.5</b>	<b>Inkubacija s primarnimi in sekundarnimi protitelesi</b> .....	29
<b>3.7.6</b>	<b>Detekcija z ojačano kemiluminiscenco</b> .....	30
3.8	DOLOČANJE ŠTEVILA CELIC MDA-MB-231 IN PC-3 Z BARVILOM HOECHST.....	31
3.9	STATISTIČNE METODE.....	31
<b>4</b>	<b>REZULTATI Z RAZPRAVO</b> .....	32
4.1	VPLIV MODULATORJEV ENERGIJSKE PRESNOVE NA MITOHONDRIJSKI MEMBRANSKI POTENCIAL IN AKTIVNOST FUMARAZE V CELICAH RAKA DOJKE MDA-MB-231 IN RAKA PROSTATE PC-3.....	32
4.2	MITOHONDRIJSKI MEMBRANSKI POTENCIAL CELIC MDA-MB-231 PRI TRETIRANJU Z RAZLIČNIMI KONCENTRACIJAMI METFORMINA .....	36
4.3	VPLIV METFORMINA NA NASTAJANJE LAKTATA V CELICAH MDA-MB-231 IN PC-3 .....	38

4.4	VPLIV INHIBICIJE KOMPLEKSA IV NA Z METFORMINOM SPODBUJENO AKTIVACIJO AMPK V CELICAH MDA-MB-231 IN PC-3 .....	39
<b>4.4.1</b>	<b>Endogeni kontroli GAPDH in aktin .....</b>	<b>40</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Fosforilacija AMPK in ACC .....</b>	<b>43</b>
4.5	VPLIV METFORMINA NA INDUKCIJO TRANSKRIPCIJSKEGA DEJAVNIKA HIF-1 $\alpha$ V CELICAH MDA-MB-231 IN PC-3.....	46
4.6	VPLIV INHIBICIJE KOMPLEKSA IV NA ANTIPROLIFERATIVNE UČINKE METFORMINA V KULTURI CELIC MDA-MB-231 IN PC-3.....	48
4.7	VPLIV KONCENTRACIJE GLUKOZE NA ANTIPROLIFERATIVNI UČINEK METFORMINA NA CELICE PC-3 .....	52
4.8	ZAKLJUČKI IN IZHODIŠČA ZA NADALJNJE RAZISKAVE.....	55
<b>5</b>	<b>SKLEPI .....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>59</b>
<b>7</b>	<b>VIRI.....</b>	<b>61</b>

**ZAHVALA**



**KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica 1: Pregled uporabljenih učinkovin.....	23
Preglednica 2: Pregled uporabljene opreme .....	24
Preglednica 3: Sestava 1× Laemmelijevega pufra.....	27
Preglednica 4: Sestava 10× Tris glicinskega pufra za prenos (1 L) .....	28
Preglednica 5: Sestava 20× pufra TBST .....	29
Preglednica 6: Primarna protitelesa .....	30

**KAZALO SLIK**

Slika 1: Metabolizem rakavih celic .....	5
Slika 2: Krepsov cikel in elektronska prenašalna veriga .....	12
Slika 3: Učinki delovanja metformina .....	16
Slika 4: Shema sendviča za prenos proteinov iz gela na membrano .....	28
Slika 5: Mitohondrijski membranski potencial celic MDA-MB-231 in PC-3 po 40 minutah tretiranja z različnimi modulatorji energijske presnove.....	32
Slika 6: Aktivnost fumaraze v celicah MDA-MB-231 in PC-3 po 24 urah tretiranja z različnimi modulatorji energijske presnove.....	35
Slika 7: Vpliv metformina na mitohondrijski membranski potencial celic MDA-MB-231 po 24 urah tretiranja z različnimi koncentracijami metformina.....	37
Slika 8: Nastajanje laktata v mediju celic MDA-MB-231 in PC-3 po 24-urni izpostavljenosti metforminu in drugim modulatorjem energijske presnove.....	38
Slika 9: S Ponceau S pobarvana membrana ločenih proteinov v vzorcih MDA-MB-231 in PC-3 celic po 24-urni izpostavitvi različnim modulatorjem energijske presnove .....	40
Slika 10: Endogeni kontroli GAPDH in aktin v celicah MDA-MB-231 .....	41
Slika 11: Endogeni kontroli GAPDH in aktin v celicah PC-3 .....	42
Slika 12: Fosforilacija AMPK na Thr <sup>172</sup> in njene tarče ACC na Ser <sup>79</sup> v celicah MDA-MB-231.....	43
Slika 13: Fosforilacija AMPK na Thr <sup>172</sup> in njene tarče ACC na Ser <sup>79</sup> v celicah PC-3 .....	45
Slika 14: Izražanje HIF-1 $\alpha$ v celicah MDA-MB-231.....	47
Slika 15: Izražanje HIF-1 $\alpha$ v celicah PC-3.....	47
Slika 16: Ocena števila celic MDA-MB-231 in PC-3 z barvilom Hoechst po 24 urah izpostavljenosti modulatorjem energijske presnove v hranilnem mediju s serumom.....	48
Slika 17: Ocena števila celic MDA-MB-231 in PC-3 z barvilom Hoechst po 24 urah izpostavljenosti modulatorjem energijske presnove v hranilnem mediju brez seruma .....	51
Slika 18: Ocena števila celic PC-3 z barvilom Hoechst po 24, 48 in 72 urah izpostavljenosti metforminu.....	52
Slika 19: Ocena števila celic PC-3 z barvilom Hoechst po 48 in 72 urah izpostavljenosti metforminu v mediju z različno koncentracijo glukoze.....	55

**OKRAJŠAVE IN SIMBOLI**

(p)ACC	(fosforilirana) acetyl-CoA karboksilaza
ACL	od ATP-odvisna citrat liaza
Akt	protein kinaza B
$\alpha$ KDH	$\alpha$ -ketoglutarat dehidrogenaza
(p)AMPK	(fosforilirana) z AMP-aktivirana protein kinaza
ANT	adenin nukleotid translokaza
Bak	angl. BCL2-antagonist/killer – pro-apoptotski protein iz družine Bcl-2
Bax	angl. BCL2-associated X protein – pro-apoptotski protein iz družine Bcl-2
BCA	angl. Bicinchoninic acid assay – test bikinkoninične kisline za določanje celokupne koncentracije proteinov v vzorcu
CaMKK2	angl. $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 – od $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulina-odvisna protein-kinaza kinaza 2
CoA-SH	neacilirana oblika koencima A
$\text{CoCl}_2$	kobalt(II) klorid
CoQ	koencim $\text{Q}_{10}$
CS	citrat sintaza
CytC	angl. cytochrome c – citokrom c
DCA	angl. dichloroacetate – dikloroacetat
DMSO	dimetil sulfoksid
ECL	angl. enhanced chemiluminescence – ojačana kemiluminiscenca
Erk1/2	angl. extracellular signal-regulated kinase – z zunajceličnim signalom regulirana kinaza 1/2
$\text{FADH}_2$	flavin adenin dinukleotid
FBS	angl. fetal bovine serum – fetusni serum goveda

FCCP	karbonil-cianid-4-(trifluorometoksi) fenilhidrazon
FH	fumarat hidrataza
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
GLUT	angl. glucose transporter – glukozni prenašalec
GSH	reducirani glutation
HIF	angl. hypoxia inducible factor – s hipoksijo inducirani dejavnik
IDH	izocitrat dehidrogenaza
IRS	angl. insulin receptor substrate family – substratni proteini inzulinskega receptorja
LDH	laktat dehidrogenaza
LKB1	angl. liver kinase B1 – jetrna kinaza B1
MATE1	angl. multidrug and toxin extrusion transporter 1 – proton/kationski antiporter, odgovoren za izločanje snovi iz celic
MDA-MB-231	celična linija raka dojke
MDH	malat dehidrogenaza
MEK1/2	angl. mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase – z mitogenom aktivirana in z zunajceličnim signalom regulirana protein kinaza kinaza
MF	metformin
MPT	angl. mitochondrial permeability transition pore – mitohondrijska prepustnostna tranzicijska pora
mTORC1	angl. mammalian target of rapamycin complex 1 – kompleks 1 kinaze mTOR
Myc	angl. v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog - onkogen myc, ki spodbuja glutaminolizo
N	število neodvisnih izvedb poskusa
n	število vseh bioloških ponovitev upoštevanih v rezultatih

NaCN	natrijev cianid
NAD(P)H	nikotinamid adenin dinukleotid (fosfat)
OAA	oksaloacetat
OCT	angl. organic cation transporter – prenašalec organskih kationov
OCTN1	angl. organic cation/carnitine transporter 1 – prenašalec organskih kationov/karnitina 1
p53	tumor supresorski protein p53, ki regulira celični cikel
PBS	fosfatni pufer s fiziološko raztopino
PC-3	celična linija raka prostate PC-3
PDH	piruvat dehidrogenaza
PDHK	piruvat dehidrogenaza kinaza
PDHP	piruvat dehidrogenaza fosfataza
PEP	fosfoenolpiruvat
PEPCK-M	mitohondrijska fosfoenolpiruvat karboksikinaza
PFK	fosfofruktokinaza
PI3K	fosfatidilinozitol-3-kinaza
PKM2	piruvat kinaza M2
PTEN	angl. phosphatase and tensin homolog – fosfataza, ki defosforilira fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat in s tem negativno regulira delovanje PI3K
PVDF	poliviniliden difluorid
Rag GTPaza	angl. recombination activating gene guanosine triphosphatase – protein, ki posreduje aktivacijo mTORC1
Ras	angl. rat sarcoma viral oncogene homolog – onkogen, ki deluje kot mala GTPaza
RHEB	angl. Ras homolog enriched in brain – GTP-vezavni protein
ROS	reaktivne kisikove zvrsti

RPMI 1640	hranilni medij RPMI 1640
SCO2	angl. synthesis of cytochrome c oxidase 2 – protein, ki omogoča pravilno sestavljanje kompleksa IV dihalne verige
SCS	sukcinil-CoA sintetaza
SDH	sukcinat dehidrogenaza
SDS	angl. sodium dodecyl sulfate – natrijev dodecil sulfat
SEM	standardna napaka povprečja
Ser <sup>485</sup>	serinski ostanek $\alpha$ podenote AMPK, ki ga fosforilira Akt
Ser <sup>79</sup>	serinski ostanek na fosforilacijskem mestu ACC1, ki ga fosforilira AMPK
SREBP	angl. sterol regulatory element-binding protein – transkripcijski dejavnik
TBST	angl. tris buffered saline with Tween – Tris puferna raztopina s soljo in Tween-om
Thr <sup>172</sup>	treoninski ostanek na aktivacijski zanki $\alpha$ -podenote AMPK, ki ga fosforilirata LKB1 ali CaMKK2
TIGAR	angl. TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator – s TP53 inducirani regulator glikolize in apoptoze
TMRM	fluorescentno kationsko barvilo tetrametilrodamin metil
TSC2	angl. tuberous sclerosis complex 2 – protein, prek katerega AMPK posreduje inhibicijo mTORC1
UCP2	angl. mitochondrial uncoupling protein 2 – mitohondrijski prenašalec anionov
VDAC	angl. voltage-dependent anion channel – napetostno odvisni anionski kanali
VHL	angl. von Hippel–Lindau – tumor supresorski protein VHL, ki omogoči razgradnjo HIF-1 $\alpha$ v proteasomu

## 1 UVOD

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Epidemiološke študije so nakazale, da zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2 z metforminom zmanjšuje tveganje za nastanek raka dojke in nekaterih drugih vrst raka (Luengo in sod., 2014; Pollak, 2012; Viollet in sod., 2012). Mehanizem, prek katerega naj bi metformin zaviral razvoj raka dojke, ni popolnoma znan. Nastanek raka bi lahko zaviral posredno prek sistemskih presnovnih učinkov, ki privedejo do zmanjšanja koncentracij glukoze in inzulina v plazmi (Pollak, 2012). Nekateri podatki pa kažejo, da bi metformin lahko deloval tudi neposredno na celice raka dojke z inhibicijo kompleksa I mitohondrijske dihalne verige (Andrzejewski in sod., 2014). Z zmanjšanjem učinkovitosti dihalne verige in nastajanja adenzin trifosfata (ATP) (Andrzejewski in sod., 2014) naj bi metformin posredno spodbudil aktivacijo z AMP-aktivirane protein kinaze (AMPK) (Hao in sod., 2010). AMPK zaustavi rast rakavih celic, vendar pa omogoči njihovo preživetje v stanju energijskega stresa (Jeon in Hay, 2012). Na biologijo raka in njegovo napredovanje imata ključen vpliv aktivna s hipoksijo inducirana dejavnika 1 in 2 (HIF-1 in HIF-2), saj je njuna raven v rakavih celicah bistveno višja kot v ne-rakavih celicah (Talks in sod., 2000). Metformin bi naj z delovanjem na signalne poti, ki regulirajo HIF-1, pripomogel k zmanjšanju stabilizacije njegove podenote HIF-1 $\alpha$  s hipoksijo (Wheaton in sod., 2014).

Rezultati dosedanjih raziskav niso povsem enoznačni, zato so mehanizmi, po katerih naj bi metformin neposredno zaviral rast celic raka dojke, zaenkrat še slabo opredeljeni. Nejasno je na primer, zakaj metformin zavira rast celic raka dojke v razmerah *in vitro* šele v zelo visokih koncentracijah, ki jih pri zdravljenju sladkorne bolezni pri bolniku ne moremo doseči (Liu in sod., 2009; Marinello in sod., 2015). Nejasno je tudi, zakaj visoke koncentracije glukoze ščitijo rakave celice pred antiproliferativnimi učinki metformina (Zorodky in sod., 2014). Vpliv metformina na rakave celice naj bi bil tesno povezan z aktivnostjo mitohondrijev, saj vanje prehaja v odvisnosti od polarizacije mitohondrijev (Chandel 2014; Foretz in sod., 2014; Wheaton in sod., 2014). Njegov učinek na rakave celice pa je odvisen predvsem od njihovih metabolnih in genetskih lastnosti (Pollak, 2012).

### 1.2 CILJI MAGISTRSKEGA DELA

Naš cilj je bil osvetliti učinke metformina na energijsko presnovo celic raka dojke. Kot eksperimentalni model smo uporabili celično linijo MDA-MB-231, ki je eden najpogosteje uporabljenih modelov za preučevanje raka dojke *in vitro*. Pri preučevanju vpliva metformina na energijsko presnovo v celicah MDA-MB-231 smo se osredotočili na delovanje mitohondrijev, ki predstavljajo glavno farmakološko tarčo metformina. Da bi preverili, ali se celice raka dojke odzivajo na metformin podobno kot celice drugih vrst

raka, smo vpliv metformina na delovanje mitohondrijev preučili še v celicah raka prostate PC-3.

Namen dela smo strnili v preučevanje šestih hipotez:

1. Metformin zmanjša mitohondrijski membranski potencial v celicah MDA-MB-231.
2. Metformin poveča nastajanje laktata v celicah MDA-MB-231 in PC-3.
3. Inhibicija kompleksa IV dihalne verige poveča z metforminom spodbujeno aktivacijo AMPK v celicah MDA-MB-231 in PC-3.
4. Metformin zavira indukcijo transkripcijskega dejavnika HIF-1 $\alpha$  v celicah MDA-MB-231 in PC-3.
5. Inhibicija kompleksa IV dihalne verige poveča antiproliferativni učinek metformina na celice MDA-MB-231 in PC-3.
6. Antiproliferativni učinek metformina na celice PC-3 je odvisen od koncentracije glukoze.



## 2 PREGLED OBJAV

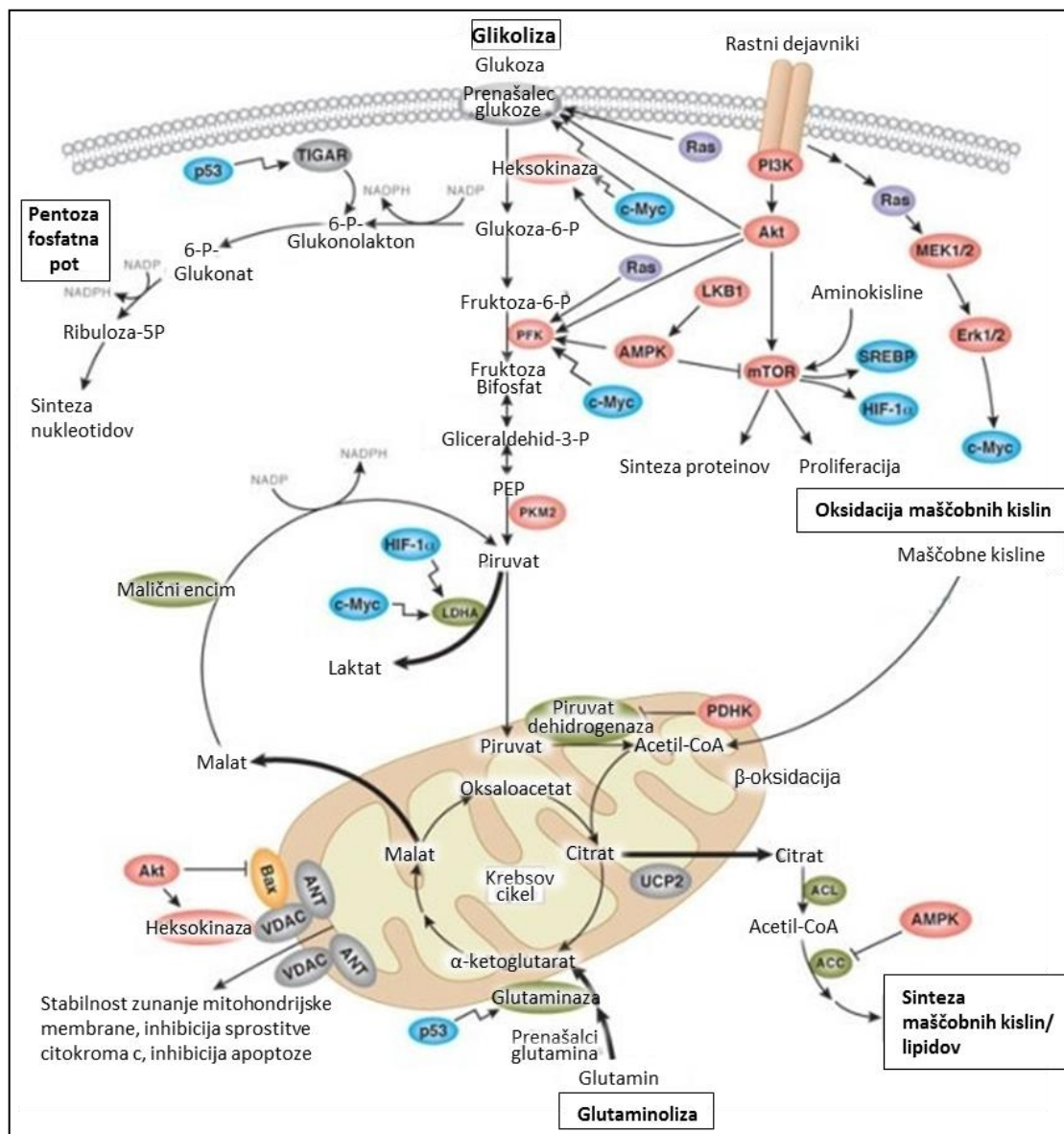
### 2.1 RAK DOJKE

Rak dojke je najpogosteje diagnosticirana vrsta raka pri ženskah v Sloveniji (Rak v Sloveniji 2012, 2015). Trojno negativni tip raka dojke ima najbolj agresiven fenotip in predstavlja 15-20 % vseh primerov raka dojke. Ta tip raka dojke ne izraža estrogenskih receptorjev, progesteronskih receptorjev in receptorjev 2 humanega epidermalnega rastnega dejavnika (Podo in sod., 2010; Porro in sod., 2014; Zorodky in sod., 2014), zanj pa je značilno povečano izražanje bazalnih citokeratinov in receptorjev epidermalnega rastnega dejavnika (Liu in sod., 2009). Receptor 2 humanega epidermalnega rastnega dejavnika je protein tirozin kinaza, ki regulira izražanje in stabilizacijo perifernih mikrotubulov ter spodbuja sintezo proteinov in celično rast (UniProtKB, 2014b). Aktivacijo receptorja ne povzroči vezava epidermalnega rastnega dejavnika ampak dimerizacija, pri kateri lahko pride do nastanka homodimera ali heterodimera z receptorjem epidermalnega rastnega dejavnika (UniProtKB, 2014b), ki je površinski receptor epidermalnih rastnih dejavnikov s tirozin kinazno aktivnostjo (UniProt KB, 2014a). Aktivacijo receptorja epidermalnega rastnega dejavnika omogoči vezava ligandov iz družine epidermalnih rastnih dejavnikov, kar povzroči homo- in/ali heterodimerizacijo in avtofosforilacijo. Aktiven receptor epidermalnega rastnega dejavnika spodbudi aktivacijo različnih signalnih poti, tudi za rakave celice pomembno fosfatidilinozitol-3-kinaza (PI3K)/ protein kinaza B (Akt) signalno pot (UniProt KB, 2014a).

Stopnja preživetja je pri trojno negativnem tipu raka dojke precej nizka, tudi če ga odkrijejo v zgodnjih stadijih (Porro in sod., 2014). Zdravljenje takega raka je zaradi pomanjkanja uspešnih tarčnih terapij (Podo in sod., 2010; Porro in sod., 2014) pravi izziv; stopnja proliferacije je namreč 3-krat višja kot za hormonske receptorje pozitivnih tipov raka dojke, uspešnost odkrivanja z mamografijo ali ultrazvokom pa je precej nizka (Porro in sod., 2014). Trojno negativni tip raka dojke v glavnem prizadene mlajše ženske, ponavadi pa ga odkrijejo šele v višjih stadijih, ko tvori že večje tumorje (Porro in sod., 2014). Nova zdravila za tarčno zdravljenje trojno negativnega raka dojke, ki so trenutno predmet številnih raziskav, so zdravila, ki temeljijo na platini, inhibitorji poli-ADP-riboza polimeraze, inhibitorji receptorjev (tirozinskih kinaz) epidermalnih rastnih dejavnikov in žilnih endotelijskih rastnih dejavnikov ter monoklonska protitelesa proti epidermalnim rastnim dejavnikom in žilnim endotelijskim rastnim dejavnikom (Porro in sod., 2014). Na pojavnost tega tipa raka dojke naj bi poleg oralnih kontracepcijskih sredstev in stanja menopavze vplivala tudi debelost (Porro in sod., 2014). Trojno negativni rak dojke naj bi bil tako pogostejši pri debelih ženskah s sladkorno bolezenijo tipa 2 (Liu in sod., 2009).

## 2.2 METABOLIZEM RAKAVIH CELIC

Spremenjen metabolizem rakavim celicam omogoča tako preživetje v neugodnih razmerah, kot sta hipoksija in pomanjkanje hranil, kot tudi proliferacijo, napredovanje, invazijo in tvorbo metastaz (Dakubo, 2010). V primerjavi z normalnimi imajo rakave celice močno povečan privzem glukoze prek glukoznih prenašalcev in večjo stopnjo glikolize. To omogoča nastanek večje količine glikolitičnih intermediatov in z glikolizo proizvedenega adenozin trifosfata (ATP). Večji delež nastalega piruvata ne vstopi v Krebsov cikel, temveč se v citosolu rakave celice z aktivno laktat dehidrogenazo pretvori v laktat kljub zadostni količini prisotnega kisika (Slika 1) (Lu in sod., 2015). Rakave celice imajo torej v primerjavi z večino normalnih celic izrazito pospešeno glikolizo, tudi kadar je na voljo dovolj kisika. Ta metabolni fenomen imenujemo aerobna glikoliza ali Warburgov efekt po odkritelju Ottu Warburgu (Dakubo, 2010; Lu in sod., 2015). Warburg je predvideval, da je preusmeritev oksidativnega metabolizma v energijsko manj učinkovit glikolitični metabolizem ob prisotnosti kisika posledica okvarjenih mitohondrijev, ki ne morejo izvajati oksidativne fosforilacije (Chen in sod., 2015; Dakubo, 2010; Ward in Thompson, 2012). Danes je znano, da so mitohondriji rakavih celic lahko popolnoma funkcionalni (Chen in sod., 2015; Lu in sod., 2015; Ward in Thompson, 2012). Funkcionalnost mitohondrijev trojno negativnega tipa raka dojke so posredno potrdili Liu in sod. (2009), ki so z uporabo metformina inducirali spremembe v signalnih poteh, zaradi katerih je prišlo do zaustavitve celičnega cikla in aktivacije programirane celične smrti *in vitro* ter zmanjšanja tumorjev *in vivo*. Marinello in sod. (2015) so poleg vpliva metformina na proliferacijo zaznali še poškodbe DNA.



**Slika 1: Metabolizem rakavih celic** (Glycolysis, 2012). Spremenjena signalna pot PI3K/Akt/mTORC1 omogoči povečanje izražanja genov za glikolitične encime in glukozne transporterje, s čemer spodbuja za rakave celice značilno visoko stopnjo glikolize, tudi ob prisotnosti kisika. Večina nastalega piruvata ne gre v Krebsov cikel, ampak se porabi za nastanek laktata, zato imajo rakave celice značilno povečano alternativno oskrbo Krebsovega cikla z glutaminom. Intermedianti glikolize in Krebsovega cikla se prednostno porabljajo v anaboličnih poteh za sintezo nukleotidov, aminokislin in maščobnih kislin, kar omogoča hitro rast in proliferacijo rakavih celic. Okrajšave: onkogen, ki deluje kot mala GTPaza (Ras), z mitogenom aktivirana protein in z zunajceličnim signalom regulirana kinaza kinaza 1/2 (MEK 1/2), z zunajceličnim signalom regulirana kinaza 1/2 (Erk 1/2), na sterol regulatorne elemente vezavni protein (SREBP), fosfofruktokinaza (PFK), piruvat kinaza M2 (PKM2), laktat dehidrogenaza (LDH), piruvat dehidrogenaza kinaza (PDHK),

odklopni protein 2, ki deluje kot mitohondrijski prenašalec anionov (UCP2), od ATP-odvisna citrat liaza (ACL), adenin nukleotid translokaza (ANT).

## 2.2.1 Molekularna osnova aerobne glikolize in fenotipa rakavih celic

Hitro deleče se celice imajo povečano potrebo po osnovnih gradnikih (nukleotidi, aminokisliline in maščobne kisline) za podvojitev svoje biomase in tvorbo hčerinskih celic, ne pa zgolj po čim večji količini ATP (Ward in Thompson, 2012). Intermediati, ki nastanejo pri glikolitični razgradnji glukoze, se v anabolnih poteh porabijo kot prekursorji za sintezo makromolekul (Lu in sod., 2015). Večina rakavih celic uporablja svoje mitohondrije za tvorbo ATP, vendar je ta za mitohondrijske encime drugotnega pomena, saj so ti v rakavih celicah prednostno vključeni v sintezo anabolnih prekursorjev (Ward in Thompson, 2012). Odvisnost rakavih celic od aktivnosti mitohondrijskih encimov v anabolnih poteh bi lahko izkoristili za zdravljenje raka s tarčnim delovanjem na mitohondrije.

### 2.2.1.1 Spremembe v izražanju in aktivnosti glikoličnih encimov

Glikolizo regulirajo trije alosterični encimi: heksokinaza, fosfofruktokinaza-1 in piruvat kinaza (Šmrec in sod., 2011). Prek prenašalcev glukoze preide glukoza v citosol celice, kjer jo heksokinaza fosforilira v glukozo-6-fosfat, s čemer se ohranja koncentracijski gradient, ki omogoči dotok glukoze v celico (Dakubo, 2010). Pri večini rakov prevladuje heksokinaza II, ena od štirih izooblik, ki neposredno interagira z napetostno odvisnimi anionskimi kanali VDAC (angl. »*voltage-dependent anion channel*«) na mitohondrijih (Slika 1). Z vezavo na VDAC je heksokinazi II omogočena poraba mitohondrijskega ATP za fosforilacijo glukoze, s čemer vzdržuje visoko stopnjo glikolize (Dakubo, 2010; Gogvadze in sod., 2010). Interakcija heksokinaze II z VDAC pripomore k izmiku rakavih celic programirani celični smrti. Z vezavo namreč drži VDAC v odprtem stanju in tako prepreči začetek intrinzične programirane celične smrti, do katere bi sicer prišlo ob zaprtju kanala (Gogvadze in sod., 2010). V odprtem stanju VDAC omogoča izmenjavo ADP in ATP ter normalno delovanje mitohondrija, v zaprtem stanju pa naj bi se prepustnost kanala za kalcijeve ione povečala. Zaradi vstopa kalcijevih ionov v mitohondrij bi naj prišlo do odprtja mitohondrijske prepustnostne tranzicijske pore (angl. »*mitochondrial permeability transition pore*«- MPT pora), vdora vode in ionov v matriks mitohondrija, to pa bi povzročilo otekanje mitohondrija in poškodbe zunanje mitohondrijske membrane (Tan in Colombini, 2007). Poleg tega heksokinaza II zasede vezavna mesta za proteine iz družine Bax in Bak, ki v primeru vezave na te kanale spodbujajo celično smrt (Slika 1) (Gogvadze in sod., 2010).

Najbolj zapleten nadzor nad procesom glikolize ima fosfofruktokinaza-1. Ta katalizira fosforilacijo fruktoze-6-fosfat v fruktozo-1,6-bifosfat (Slika 1). Aktivatorji fosfofruktokinaze-1 so fruktoza-2,6-bifosfat, ki jo sintetizira fosfofruktokinaza-2, ADP ali

AMP, močna inhibitorja pa citrat in ATP (Šmerc in sod., 2011). Povečana aktivnost fosfofruktokinaze-1 v rakavih celicah bi naj bila povezana z okrnjenim delovanjem tumor supresorskega proteina p53 (Šmerc in sod., 2011), ki je značilno tudi za celice raka dojke MDA-MB-231 (Zorodky in sod., 2014). Zato je količina encima s TP53- inducirane regulatorja glikolize in apoptoze TIGAR (angl. »*TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator*«), ki deluje kot fruktoza-1,6-bifosfataza, zmanjšana, raven fruktoze-1,6-bifosfata v rakavih celicah pa povečana (Šmerc in sod., 2011). Šmerc in sod. (2011) poročajo, da bi lahko onkogen Akt spodbujal glikolitični metabolizem rakavih celic tudi prek posttranslacijskih modifikacij fosfofruktokinaz-1 s proteolitskimi encimi. Z modifikacijami fosfofruktokinaze-1 izgubijo vezavna mesta za citrat in ATP in zato postanejo neobčutljive na inhibicijo, na fruktoza-2,6-bifosfat pa postanejo občutno bolj občutljive v primerjavi z nespremenjenimi encimi. Ker njihove encimske sposobnosti ob tem ostanejo nespremenjene, se močno poveča hitrost pretvorbe fruktoze-6-fosfat v fruktozo-1,6-bifosfat (Šmerc in sod., 2011).

Piruvat kinaza katalizira pretvorbo fosfoenolpiruvata v piruvat (Slika 1). Vse do sedaj analizirane rakave celice sintetizirajo alternativno izrezano izoobliko M2 piruvat kinaze (Ward in Thompson, 2012), ki je slabše aktivna kot M1 izooblika, ki prevladuje v diferenciranih ne-rakavih celicah (Wallace, 2012). Počasnejša M2 piruvat kinaza omogoča rakavim celicam kopičenje glikolitičnih intermediatov za vzdrževanje anabolnih procesov in tvorbo nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) v pentoza fosfatni poti (Chen in sod., 2015; Wallace, 2012; Ward in Thompson, 2012).

### 2.2.1.2 Spremembe v aktivnosti signalnih poti

#### *Signalna pot PI3K/Akt/mTORC1*

Fenotipske lastnosti rakavih celic so posledica genetskih in epigenetskih sprememb v proto-onkogenih in tumor supresorskih genih, ki odločilno vplivajo na reprogramiranje metabolizma (Dakubo, 2010; Lu in sod., 2015; Ward in Thompson, 2012). Ključni dejavnik, ki vpliva na vzpostavitev glikolitičnega metabolizma rakavih celic, je spremenjena signalizacija rastnih dejavnikov prek signalne poti PI3K, Akt in kompleksa 1 kinaze mTOR (mTORC1) (angl. »*mammalian target of rapamycin complex 1*«) (Šmerc in sod., 2011). Ta signalna pot poleg metabolizma uravnava tudi rast in preživetje celic, privzem glukoze, aktivnost heksokinaze in vzdržuje mitohondrijski membranski potencial (Dakubo, 2010). PI3K/Akt je signalna pot, prek katere inzulin spodbudi privzem glukoze v celice. Po vezavi inzulina na inzulinski receptor se ta aktivira z avtofosforilacijo in naprej fosforilira substratne proteine inzulinskega receptorja (angl. »*insulin receptor substrate family*«- IRS), ki posredujejo fosforilacijo in aktivacijo PI3K. Aktivna PI3K omogoči nastanek fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfata, ki regulira aktivacijo številnih proteinov, med drugim tudi Akt (Chang in sod., 2004). Do konstitutivne aktivnosti PI3K/Akt signalne poti

v rakavih celicah lahko pride zaradi mutacij v genu za tumor supresorski protein PTEN (angl. »*phosphatase and tensin homolog*«) (Dakubo, 2010), ki deluje kot fosfataza in z defosforilacijo fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfata (Chang in sod., 2004) negativno regulira delovanje PI3K (Dakubo, 2010).

Akt poveča izražanje genov za glukozne prenašalce (GLUT1 in GLUT3) in posreduje lokalizacijo GLUT4 na plazemsko membrano celic, s čemer spodbudi privzem glukoze (Barron in sod., 2016). Spremenjen nabor glukoznih prenašalcev različnim rakavim celicam omogoča večji privzem glukoze in fruktoze. Po nekaterih podatkih naj bi celice raka dojke imele povečano izražanje GLUT1 in GLUT3, s čemer rezultati drugih študij ne sovpadajo in navajajo povečano izražanje GLUT2, GLUT4, GLUT6 in GLUT12 (Barron in sod., 2016). Akt s fosforilacijo aktivira pomembne glikolitične encime (heksokinazo II in fosfofruktokinazo-2) in tako stimulira proces aerobne glikolize (Dakubo, 2010; Wallace, 2012; Ward in Thompson, 2012). S spodbujanjem premestitve heksokinaze II na VDAC (Slika 1) Akt pripomore k izmiku procesu programirane celične smrti (Gogvadze in sod., 2010). Poleg tega ima Akt pomembno vlogo tudi pri *de novo* sintezi maščobnih kislin in holesterola, pomembnih za tvorbo celičnih membran. Osnovni gradnik maščobnih kislin je acetil-CoA, ki nastaja v mitohondrijih iz piruvata z aktivno piruvat dehidrogenazo. Acetil-CoA ne more preiti v citosol, zato se poveže z oksaloacetatom v citrat, ki se izloči iz mitohondrija v citosol. Akt fosforilira in aktivira ATP-citrat liazo, ki citosolni citrat pretvori v acetil-CoA (Ward in Thompson, 2012). Tarča aktivnega Akt je tudi mTORC1, ki je znan regulator celične rasti (Slika 1). mTORC1 poveča sintezo proteinov, katerih prekursorje predstavljajo mitohondrijski intermedii (oksalacetat,  $\alpha$ -ketoglutarat) (Ward in Thompson, 2012). Akt in mTORC1 kinazi sta pomembna aktivatorja transkripcijskih dejavnikov Myc in HIF (Barbosa in sod., 2012).

### *Onkogen Myc*

Onkogen Myc (angl. »*v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*«) spodbuja glikolizo prek regulacije izražanja genov mnogih glikolitičnih encimov (Chen in sod., 2015; Dakubo, 2010). Aktivira izražanje genov za M2 piruvat kinazo in laktat dehidrogenazo, aktivira glukozne transporterje (Slika 1) (Cairns in sod., 2011; Chen in sod., 2015) in spodbuja metabolizem glutamina (Barbosa in sod., 2012; Cairns in sod., 2011). Po vstopu v celico glutaminaza pretvori glutamin v glutamat, ki služi za tvorbo reduciranega glutationa (GSH) (najpogostejši antioksidant v celicah sesalcev) ali  $\alpha$ -ketoglutarata, ki nato vstopi v Krebsov cikel za tvorbo aminokislin in maščobnih kislin (Slika 1). Myc inducira izražanje genov za transporterje glutamina in posredno poveča raven glutaminaze (Cairns in sod., 2011).

### *Transkripcijski dejavnik HIF*

S hipoksijo inducirani dejavnik HIF-1 (angl. »*Hypoxia-Inducible Factor-1*«) je transkripcijski dejavnik, ki na ravni posameznih celic in na ravni celega telesa usmerja fiziološke prilagoditve na pomanjkanje kisika (Semenza, 2010). HIF-1 sestavljata dve podenoti: regulacijska podenota HIF-1 $\alpha$ , katere izražanje uravnava koncentracija kisika, in konstitutivna podenota HIF-1 $\beta$  (Semenza, 2010). Ob prisotnosti kisika prolil hidroksilaze hidroksilirajo HIF-1 $\alpha$  na prolinskih ostankih 402 in 564 (Dakubo, 2010; Semenza, 2010), na katere se nato veže tumor supresorski protein VHL (angl. »*von Hippel-Lindau*«) (Semenza, 2010). VHL je prepoznavna enota ubikvitin-protein ligaze E3, zato interakciji med VHL in HIF-1 $\alpha$  sledi ubikvitinacija in razgradnja HIF-1 $\alpha$  v proteasomu (Gogvadze in sod., 2010; Semenza, 2010, 2013). Ob pomanjkanju kisika, ki je glavni mehanizem stabilizacije HIF-1 $\alpha$  (Semenza, 2010), do hidroksilacije HIF-1 $\alpha$  ne pride; stabiliziran HIF-1 $\alpha$  se nakopiči v jedru, kjer se s HIF-1 $\beta$  poveže v aktivni transkripcijski dejavnik, ki omogoči prepis in aktivacijo številnih tarčnih genov (Gogvadze in sod., 2010; Semenza, 2010).

V rakavih celicah stabilizirajo HIF-1 $\alpha$  neodvisno od kisika aktivirane onkogene signalne poti (PI3K/Akt/mTORC1) (Slika 1) in mutacije v genih za tumor supresorske proteine (VHL, sukcinat dehidrogenazo, fumarat hidratazo) (Barbosa in sod., 2012; Cairns in sod., 2011; Dakubo, 2010). Do povečane sinteze in stabilnosti HIF-1 $\alpha$  pride tudi zaradi izgube funkcije tumor supresorskega proteina p53 (Semenza, 2013), kar je značilno tudi za celice raka dojke MDA-MB-231 (Zorodky in sod., 2014). Na stabilnost HIF-1 $\alpha$  vpliva tudi metabolni status celic. Za hidroksilacijo HIF-1 $\alpha$  je namreč poleg kisika ključen tudi  $\alpha$ -ketoglutarat, intermediat Krebsovega cikla, ki se pri hidroksilaciji razcepi na sukcinat in CO<sub>2</sub>. S povečanjem  $\alpha$ -ketoglutarata se poveča aktivnost prolil hidroksilaz, ki posredujejo razgradno HIF-1 $\alpha$  (Semenza, 2013).

HIF-1 z aktivacijo izražanja genov za glikolitične encime in glukozne prenašalce (GLUT1 in GLUT3) (Barron in sod., 2016) pripomore h glikolitičnemu fenotipu rakavih celic (Dakubo, 2010; Wallace, 2012). Glikolizo spodbuja tudi z zaviranjem delovanja mitohondrija tako, da inducira izražanje gena za laktat dehidrogenazo (Slika 1) in gena za monokarboksilatni transporter 4, prek katerega se nastali laktat izloči iz celice (Dakubo, 2010; Semenza, 2013). Poleg tega poveča izražanje gena za piruvat dehidrogenazo kinazo, ki s fosforilacijo inhibira piruvat dehidrogenazo, kar zaustavi pretvorbo piruvata v acetyl-CoA in zavre pretok piruvata v Krebsov cikel (Cairns in sod., 2011; Dakubo, 2010; Wallace, 2012). Pri pomanjkanju kisika HIF-1 prek sprememb v izražanju genov spodbudi prilagoditve v delovanju dihalne verige, kar naj bi povečalo učinkovitost prenosa elektronov na kisik (Dakubo, 2010).

Z imunohistokemijskimi analizami so odkrili povečano raven HIF-1 $\alpha$  in HIF-2 $\alpha$  pri večini človeških primarnih tumorjev in njihovih metastazah (Talks in sod., 2000). Oba delujeta kot transkripcijska dejavnika in imata zato pomembno vlogo pri preživetju rakavih celic. Z aktivacijo tarčnih genov učinkujeta na proliferacijo, metabolizem, ožiljenje, genetsko nestabilnost, neobčutljivost na kemoterapijo in obsevanje, izogibanje imunskemu sistemu in programirani celični smrti ter na ohranjanje sposobnosti celičnih delitev (Loboda in sod., 2010; Semenza, 2010). Povečana raven HIF-1 $\alpha$  v različnih rakih pri človeku, tudi pri raku dojke, je tako povezana z napredovanjem raka in z močno povečano stopnjo umrljivosti (Semenza, 2010, 2013).

#### *Z AMP-aktivirana protein kinaza (AMPK)*

AMPK je serin/treoninska protein kinaza, ki kot glavni senzor energijskega stanja celicam pomaga ohranjati energijsko homeostazo (Faubert in sod., 2013). Poleg uravnavanja presnovnih poti ima AMPK pomembno vlogo pri regulaciji nastajanja in odstranjevanja mitohondrijev, avtofagije, polarizacije celic, rasti in proliferacije celic (Hardie, 2011).

AMPK je heterotrimerni ( $\alpha\beta\gamma$ ) kompleks, ki ga sestavljajo katalitska podenota  $\alpha$  in regulatorni podenoti  $\beta$  in  $\gamma$ . Do aktivacije AMPK pride zaradi metabolnega stresa, katerega posledica je povečano razmerje AMP:ATP in ADP:ATP. Glavna kinaza, ki fosforilira treoninski ostanek Thr<sup>172</sup> na aktivacijski zanki  $\alpha$ -podenote in tako aktivira AMPK, je tumor supresorska kinaza LKB1 (angl. »*liver kinase B1*«) (Hardie, 2011). Vezava AMP na  $\gamma$ -podenoto povzroči konformacijsko spremembo AMPK, ki omogoči njeno aktivacijo po treh neodvisnih mehanizmih: spodbudi fosforilacijo Thr<sup>172</sup> z LKB1, prepreči defosforilacijo Thr<sup>172</sup> in alosterično aktivira AMPK z že fosforiliranim Thr<sup>172</sup> (Hardie, 2015). Delovanje AMPK lahko s preprečevanjem defosforilacije Thr<sup>172</sup> regulira tudi ADP (Hardie, 2015). V celicah je koncentracija ATP in ADP precej višja od AMP. V stanju hudega energijskega stresa, ko se raven AMP približa ADP, se AMP veže na AMPK in povzroči alosterično aktivacijo, ki 10-krat poveča s fosforilacijo Thr<sup>172</sup> povzročeno več kot 200-kratno aktivacijo AMPK, kar skupno pomeni kar več kot 2000-kratno aktivacijo AMPK (Hardie, 2011).

LKB1 je konstitutivno aktivna (Hardie, 2011) in fosforilira AMPK, vendar če ne pride do vezave AMP ali ADP, se AMPK defosforilira (Hardie, 2015). Poleg LKB1 lahko fosforilacijo Thr<sup>172</sup> posreduje tudi od Ca<sup>2+</sup>/kalm modulina-odvisna protein-kinaza kinaza 2 (angl. »*Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2*«, CaMKK2). CaMKK2 fosforilira AMPK ob povečani koncentraciji kalcijevega iona v citosolu neodvisno od spremembe energijskega stanja celice (Hardie, 2011; Jeon in Hay, 2012; Jeon in sod., 2012). V negativno regulacijo AMPK je vključena z inzulinom aktivirana protein kinaza B ali Akt, ki fosforilira serinski ostanek Ser<sup>485</sup> podenote  $\alpha$ 1 in s tem prepreči kasnejšo fosforilacijo Thr<sup>172</sup> z LKB1 ali s CaMKK2 (Hardie, 2011, 2015).



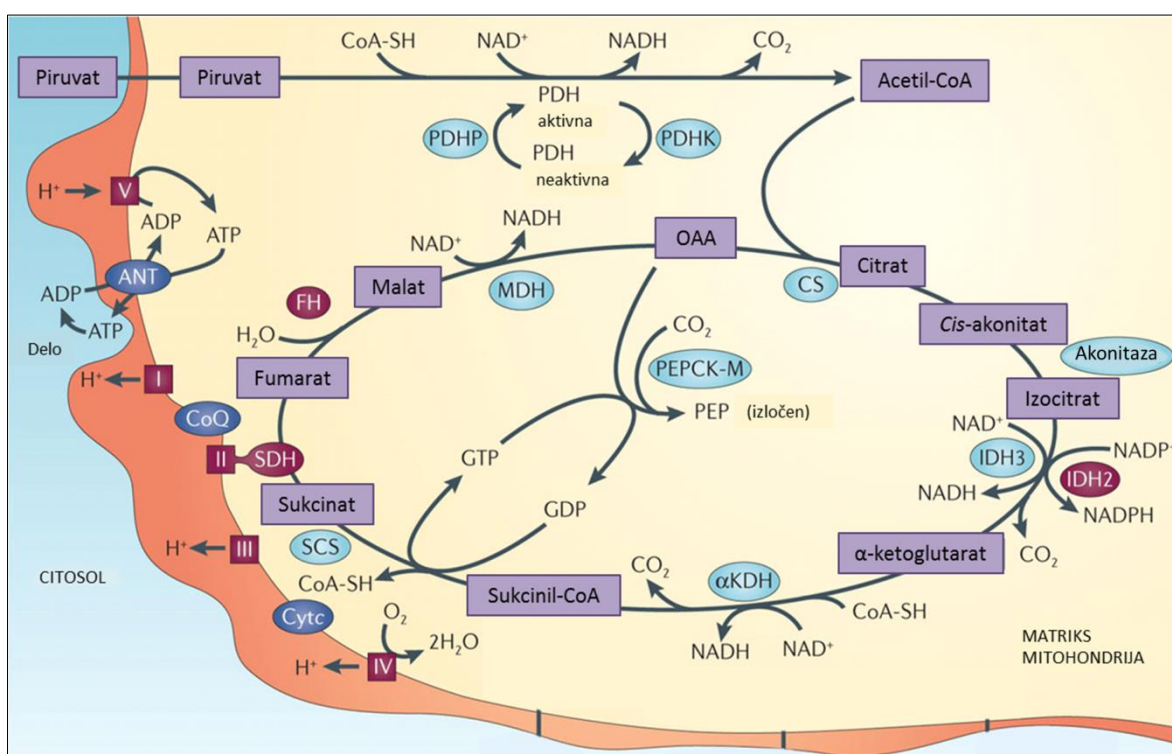
Aktivna AMPK zavre anabolne poti, v katerih se ATP porablja, in spodbudi katabolne poti, v katerih ATP nastaja (Hardie, 2011; Jeon in Hay, 2012), s čemer celicam pomaga ohranjati energijsko homeostazo. AMPK z aktivacijo prenašalcev glukoze GLUT1 in GLUT4 poveča vnos glukoze, s fosforilacijo in aktivacijo fosfofruktokinaze-2 spodbuja glikolizo, s translokacijo prenašalca maščobnih kislin poveča vnos maščobnih kislin, s fosforilacijo in inaktivacijo acetil-koencim A karboksilaze 2 (ACC2) (Hardie, 2011) na fosforilacijskem mestu Ser<sup>212</sup>, ki je ekvivalentno Ser<sup>79</sup> na acetil-koencim A karboksilazi 1 (ACC1) (Fullerton in sod., 2013), pa omogoči oksidacijo maščobnih kislin (Hardie, 2011). ACC2 je regulator oksidacije maščobnih kislin; če se njena aktivnost zmanjša, nastane manj malonil-CoA, kar dezinhibira karnitin palmitoil transferazni sistem in omogoči vstop acetil-CoA v mitohondrij, povečanje oksidacije maščobnih kislin, nastanek NADPH in ATP ter zmanjšanje oksidativnega stresa (Jeon in Hay, 2012; Jeon in sod., 2012; Shaw, 2006; Svensson in Shaw, 2012). Z inaktivacijo mTORC1 AMPK prepreči sintezo proteinov, s fosforilacijo in inaktivacijo ACC1 na fosforilacijskem mestu Ser<sup>79</sup> (Fullerton in sod., 2013) pa zaustavi sintezo maščobnih kislin, kar vodi v zaustavitev rasti celic. ACC1 namreč katalizira pretvorbo acetil-CoA v malonil-CoA, vendar ta ne regulira karnitin palmitoil transferaznega sistema, ampak se porabi za sintezo maščobnih kislin (Jeon in Hay, 2012). Posredno prek regulacije metabolizma maščobnih kislin AMPK regulira tudi homeostazo NADPH (Jeon in Hay, 2012; Jeon in sod., 2012; Svensson in Shaw, 2012) in vzdržuje tvorbo reduciranega glutationa (GSH) (Jeon in Hay, 2012), ki deluje kot kofaktor mnogih encimov ter predstavlja redukcijsko moč v številnih encimskih reakcijah (Carins in sod., 2011).

Aktivacija AMPK v rakavih celicah v kulturi bi naj s povečanjem izražanja in stabilizacijo p53 zaustavila celični cikel in s tem proliferacijo celic (Hardie, 2011). V številnih rakavih celicah naj bi bila AMPK signalna pot zaradi mutacij v onkogenih in njihovih signalnih poteh motena, kar naj bi celicam omogočilo proliferacijo v še tako nenormalnih razmerah (Cairns in sod., 2011). Omejena aktivacija AMPK bi lahko bila povezana z izgubo tumor supresorske LBK1 ali s povečanjem aktivnosti Akt v rakavih celicah, ki poveča stopnjo fosforilacije Ser<sup>212</sup> in omeji aktivnost AMPK (Hardie, 2011). Sama izguba aktivnosti AMPK še ne sproži nastanka raka, skupaj z onkogeni pa spodbuja njegovo napredovanje (Faubert in sod., 2015). Oslabljena aktivnost AMPK je v rakavih celicah povezana s povečano stopnjo rasti in proliferacije, ki sta posledici povečane aktivnosti mTORC1 in zmanjšane aktivacije p53, ter s spodbujeno aerobno glikolizo in metabolizmom glutamina zaradi povečane aktivnosti HIF-1 $\alpha$  (Faubert in sod., 2013, 2015). Take rakave celice nimajo sposobnosti vzdrževanja energijske homeostaze (Faubert in sod., 2015), zato se ne morejo prilagoditi stresnim razmeram kot sta hipoksija in pomanjkanje hranil, kar lahko vodi v programirano celično smrt (Svensson in Shaw, 2012). Aktivna AMPK v rakavih celicah pa po eni strani omejuje njihovo rast in proliferacijo z inhibicijo mTORC1 in aktivacijo p53 (Faubert in sod., 2015; Jeon in Hay, 2012; Shaw, 2006; Svensson in Shaw,

2012), po drugi pa spodbuja preživetje v stanju metabolnega stresa in migracijo (Jeon in Hay, 2012).

## 2.2.2 Spremembe v delovanju mitohondrijev

Mitohondriji so za večino celic življenjskega pomena. Poleg vodilne vloge pri regulaciji tvorbe energije z oksidativno fosforilacijo modulirajo redoks stanje, proizvajajo reaktivne kisikove zvrsti (ROS), regulirajo raven citosolnega kalcija, pripomorejo k tvorbi prekursorjev za biosintezo makromolekul in kontrolirajo začetek celične smrti (Bhat in sod., 2015; Wallace, 2012).



**Slika 2: Krebsov cikel in elektronska prenašalna veriga** (Wallace, 2012: 688). Neacilirana oblika koencima A (CoA-SH), piruvat dehidrogenaza (PDH), piruvat dehidrogenaza kinaza (PDHK), piruvat dehidrogenaza fosfataza (PDHP), oksaloacetat (OAA), citrat sintaza (CS), izoobliki izocitrat dehidrogenaze 2 in 3 (IDH2, IDH3),  $\alpha$ -ketoglutarat dehidrogenaza ( $\alpha$ KDH), sukcinil-CoA sintetaza (SCS), sukcinat dehidrogenaza (SDH), fumarat hidrataza (FH), malat dehidrogenaza (MDH), citokrom c (CytC), koencim Q10 (CoQ), adenin nukleotidni translokatorji (ANT), mitohondrijska fosfoenolpiruvat karboksikinaza (PEPCK-M), fosfoenol piruvat (PEP).

Vstop acetil-CoA v Krebsov cikel posreduje citrat sintaza, ki katalizira prenos acetilne skupine iz acetil-CoA na oksaloacetat, da nastane citrat (Slika 2), ki ga encimi Krebsovega cikla postopoma oksidirajo do oksaloacetata (Alberts in sod., 2009; Wallace, 2012).

Kompleksi elektronske prenašalne verige porabljajo elektrone iz molekul reduciranega nikotinamid adenin dinukleotida (NADH) in reduciranega flavin adenin dinukleotida (FADH<sub>2</sub>) za tvorbo ATP v procesu oksidativne fosforilacije (Slika 2) (Alberts in sod., 2009). Kompleks I (NADH dehidrogenaza) oksidira NADH in posreduje elektrone na koencim Q<sub>10</sub> (ubikinon). Kompleks II (sukcinat dehidrogenaza-SDH) oksidira FADH<sub>2</sub> in elektrone prav tako posreduje na koencim Q<sub>10</sub>, ta jih nato prenese na kompleks III (citokrom b-c<sub>1</sub> kompleks). Iz kompleksa III se elektroni s citokromom c prenesejo na kompleks IV (citokrom c oksidaza), ki elektrone in protone porablja za redukcijo kisika v vodo (Slika 2) (Alberts in sod., 2009; Wallace, 2012). Energija, ki se sprosti, ko elektroni prečkajo komplekse I, III in IV, se porablja za vzpostavitev elektrokemijskega gradienta prek notranje mitohondrijske membrane (Slika 2) (Wallace, 2012). Ta poganja vstopanje protonov v matriks in nastajanje ATP v kompleksu V (ATP-sintazi). ATP-sintaza lahko z reverznim delovanjem, pri čemer se ATP porablja za transport protonov iz matriksa v medmembranski prostor (Alberts in sod., 2009; Bonnet in sod., 2007; Martínez-Reyes in sod., 2016), vzdržuje za celico pomemben mitohondrijski membranski potencial (Martínez-Reyes in sod., 2016).

#### 2.2.2.1 Spremembe v mitohondrijih rakavih celic

Bonnet in sod. (2007) so pokazali, da so mitohondriji rakavih celic hiperpolarizirani (njihova notranjost je bolj negativna), kar naj bi pripomoglo k odpornosti celic na programirano celično smrt. Skupna značilnost številnim tipom raka so mutacije v mitohondrijski DNA (Chiaradonna in sod., 2012; Wallace, 2012). Te vplivajo na uspešnost oksidativne fosforilacije in posledično pripomorejo k spremembi mitohondrijskega metabolizma, okrepijo sposobnost tvorbe tumorjev in omogočijo prilagajanje celic na spreminjajoče se okolje (Wallace, 2012). Zelo pogoste so mutacije v genih z zapisom za podenote kompleksa I dihalne verige, pogoste so tudi točkovne mutacije ali omejeno izražanje gena za podenoto 6 ATP-sintaze (Chiaradonna in sod., 2012). Mutacije so odkrili tudi v genih za citokrom b (Chiaradonna in sod., 2012) in za oksidazno podenoto 1 citokroma c (Wallace, 2012). Vse spremembe mitohondrijskih proteinov vodijo v zmanjšanje aktivnosti oksidativne fosforilacije, povečanje tvorbe ROS, ki kot sekundarni sporočevalci vplivajo na izražanje jedrnih genov (npr. HIF-1), katerih produkti modulirajo celični metabolizem (Chiaradonna in sod., 2012). Mutacije v mitohondrijskih genih spremenijo bioenergetski status in metabolizem celice tako, da ta podpira rakav fenotip (Wallace, 2012).

Do spremembe metabolizma pripomore tudi v rakavih celicah najpogosteje mutiran gen za tumor supresorski protein p53 (Chiaradonna in sod., 2012; Gogvadze in sod., 2010). Aktiven p53 spodbuja tvorbo ATP z oksidativno fosforilacijo in zmanjšanje ROS prek aktivacije izražanja gena za TIGAR (Slika 1). TIGAR preusmeri glikolitične intermediate v pentoza fosfatno pot za sintezo NADPH, ki celico zavaruje pred oksidativnim stresom.

p53 spodbuja aktivnost elektronske prenašalne verige z aktivacijo gena za protein SCO2 (angl. »*Synthesis of Cytochrome c Oxidase 2*«), ki omogoča pravilno sestavljanje kompleksa IV dihalne verige (Cairns in sod., 2011; Gogvadze in sod., 2010; Wallace, 2012). p53 zavira glikolizo s spodbujanjem izražanja gena za PTEN, ki inhibira PI3K/Akt/mTORC1 signalno pot (Cairns in sod., 2011). Mutacija ali zmanjšano izražanje gena za p53 v rakavih celicah povzroči nastanek neustreznega kompleksa IV in s tem okvaro mitohondrijske dihalne verige, povečanje stopnje glikolize, spodbujeno nastajanje ROS in inhibicijo celične smrti (Gogvadze in sod., 2010; Wallace, 2012).

#### 2.2.2.2 Metabolizem glutamina in maščobnih kislin

Izrazito povečan metabolizem glutamina je še ena metabolna posebnost rakavih celic (Barbosa in sod., 2012). Na ta način rakave celice nadomestijo oskrbo mitohondrijev s piruvatom, ki je zaradi spodbujene tvorbe laktata močno zmanjšana (Dakubo, 2010). Pri razgradnji glutamina nastaja  $\alpha$ -ketoglutarat, ki vstopa v Krebsov cikel, v katerem nastane malat (Slika 1). Večino iz glutamina nastalega malata od  $\text{NAD}^+$ -odvisna malat-dehidrogenaza ali malični encim pretvori v piruvat (Slika 1), ki ga nato laktat dehidrogenaza pretvori v laktat (Barbosa in sod., 2012; Dakubo, 2010). Delež malata, ki se ne pretvori v piruvat, tvori citrat, ki nato v citosolu podpira sintezo maščobnih kislin (Slika 1) (Dakubo, 2010). Metabolizem glutamina omogoča tudi sintezo nekaterih aminokislin (prolin, alanin, arginin, glutamat, aspartat) (Dakubo, 2010).

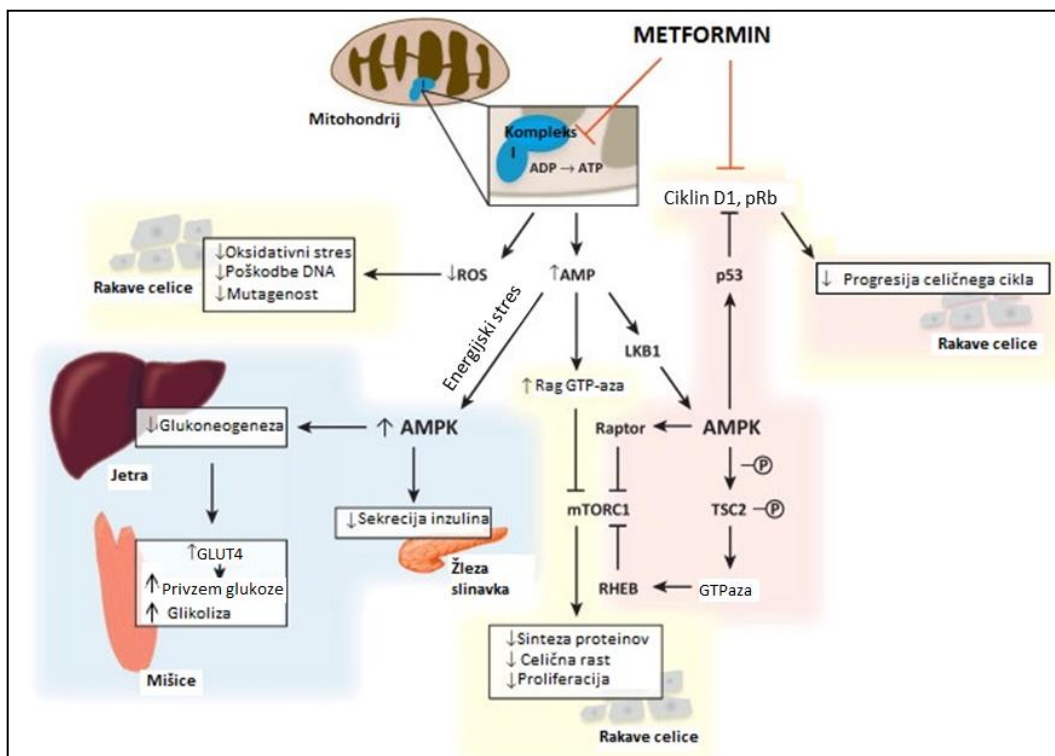
Za rakave celice je značilna povečana *de novo* sinteza maščobnih kislin, katerih osnova je acetil-CoA. Ta naj bi v citosol rakavih celic prišel po dveh poteh: iz mitohondrija po kondenzaciji acetil-CoA z oksaloacetatom v citrat, ki ga po prehodu v citosol od ATP-odvisna citrat liaza razcepi na oksaloacetat in acetil-CoA (Slika 1) (Carracedo in sod., 2013), in s privzemom acetata iz krvi, ki ga citosolna acetil-CoA sintaza pretvori v acetil-CoA (Dakubo, 2010). Citosolni oksaloacetat vstopi v verižno reakcijo sinteze piruvata z maličnim encimom, acetil-CoA pa ACC1 pretvori v malonil-CoA, ki je osnovna molekula za *de novo* sintezo maščobnih kislin (Carracedo in sod., 2013).

### 2.3 METFORMIN IN METABOLIZEM KOT SODOBNA TARČA ZA ZDRAVLJENJE RAKA

Visoka stopnja glikolize ob prisotnosti kisika, moteno delovanje dihalne verige, povečana uporaba glutamina in sinteza maščobnih kislin so za rakave celice specifične metabolne lastnosti, po katerih se bistveno razlikujejo od ne-rakavih celic. Tarčno delovanje na ključne metabolne encime, ki nadzorujejo tvorbo energije in anabolne procese, bi lahko pripomoglo k učinkovitejšemu zdravljenju raka (Chiaradonna in sod., 2012).

### 2.3.1 Metformin

Metformin je eden od bigvanidov, ki so jih razvili iz galegina, derivata gvanidina iz navadne jastrebine (*Galega officinalis*). Že desetletja je znan kot učinkovito peroralno antihyperglikemično sredstvo za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2. Pri zdravljenju z metforminom so neželeni učinki, kot sta hipoglikemija ali laktacidoza v primerjavi z drugimi podobnimi učinkovinami (npr. fenforminom), relativno redki (Graham in sod., 2011). S primerjalnimi in retrospektivnimi študijami je bilo ugotovljeno, da ima metformin po vsej verjetnosti protitumorni učinek (Pollak, 2012; Wheaton in sod., 2014), saj naj bi preprečeval nastanek raka pri sladkornih bolnikih, ki redno jemljejo metformin (Chandel, 2014), ter izboljšal odziv bolnikov z rakom na zdravljenje in zmanjšal smrtnost zaradi raka (Emami Riedmaier in sod., 2013). Številni avtorji so pokazali potencialno uporabnost metformina za zdravljenje različnih tipov raka, tudi trojno negativnega raka dojke (Liu in sod., 2009) in raka prostate (Kato in sod., 2015). Na ravni organizma deluje metformin prek zaviranja glukoneogeneze v jetrih in spodbujanja privzema glukoze v skeletne mišice in maščevje (Slika 3) (Luengo in sod., 2014). Zaradi tega upade koncentracija glukoze v krvi, kar posredno povzroči upad inzulina, znanega mitogena, ki prek aktivacije PI3K/mTORC1 signalne poti celicam omogoča preživetje in proliferacijo (Slika 3) (Chandel, 2014; Pollak, 2014; Wheaton in sod., 2014). Na celični ravni metformin tarčno deluje na mitohondrije, kjer inhibira kompleks I dihalne verige (Chandel, 2014; Foretz in sod., 2014; Pollak, 2012; Viollet in sod., 2012; Wheaton in sod., 2014). Kljub raziskavam, ki potrjujejo negativni vpliv metformina na rast celic raka dojke *in vitro* (Marinello in sod., 2015; Zorodky in sod., 2014) in *in vivo* (Lui in sod., 2009), še vedno ni povsem znano, prek katerega mehanizma naj bi metformin preprečeval razvoj raka dojke. Ni jasno, ali je protitumorni učinek metformina posledica spremenjenega metabolizma celotnega telesa in/ali tarčnega delovanja v rakavih celicah (Luengo in sod., 2014).



**Slika 3: Učinki delovanja metformina** (Emami Riedmaier in sod., 2013: 128). Na ravni organizma (modro ozadje) metformin zmanjšuje negativen vpliv inzulina na rast in napredovanje raka. Posredno prek aktivacije AMPK zniža stopnjo glukoneogeneze v jetrih ter poveča privzem glukoze in stopnjo glikolize v skeletnih mišicah. Koncentracija glukoze v krvi upade, zato se zmanjša tudi izločanje inzulina. Na ravni celic metformin prek aktivacije AMPK (rdeče ozadje), v katero je vključena LKB1, posreduje inhibicijo mTORC1 signalne poti posredno prek GTPaz ali neposredno z inhibicijo mTORC1 regulatorne podenote Raptor. Tako zaustavi sintezo proteinov, celično rast in proliferacijo. Prek aktivacije p53, ki naprej prepreči izražanje genov za ciklin D1 in protein retinoblastoma (pRb), AMPK zaustavi celični cikel. Neodvisno od AMPK (rumeno ozadje) metformin aktivira Rag GTPazo, ki prepreči pretirano signalizacijo mTORC1. Z inhibicijo kompleksa I zniža oksidativni stres in zmanjša poškodbe DNA ter stopnjo mutagenosti rakavih celic. TSC2: angl. »tuberous sclerosis complex 2«; RHEB: angl. »Ras homolog enriched in brain« (GTP-vezavni protein); LKB1: angl. »liver kinase B1« (jetna kinaza B1) (Emami Riedmaier in sod., 2013).

Privzem metformina v celice omogočajo prenašalci organskih kationov (OCT), saj je metformin hidrofilna baza, ki se pri fiziološkem pH nahaja v protonirani kationski obliki (Foretz in sod., 2014; Graham in sod., 2011). Zhang in sod. (2012) so ugotovili, da so za privzem metformina prek plazemske membrane v celice raka dojke MDA-MB-231 najverjetneje odgovorni prenašalci organskih kationov 3 (OCT3) in prenašalci MATE1 (angl. »*multidrug and toxin extrusion transporter 1*«), ki delujejo kot proton/kationski antiporterji (Nies in sod., 2011). V tej celični liniji so namreč pokazali visoko stopnjo izražanja gena za OCT3 in MATE1 (Cai in sod., 2016; Zhang in sod. 2012). Tudi MATE1,

ki je sicer odgovoren za izločanje snovi iz celic, bi lahko pripomogel k privzemu metformina, saj lahko, v odvisnosti od protonskega gradienta, prek plazemske membrane prenaša organske katione v obeh smereh (Nies in sod., 2011). Gong in sod. (2002) so z analizo izražanja genov za prenašalce organskih kationov pokazali, da imajo celice MDA-MB-231 najbolj izražene gene za prenašalca organskih kationov/karnitina 2 (angl. »*Organic Cation/Carnitine Transporter 2*«, OCTN2) in OCT3. Poleg tega celice MDA-MB-231 izražajo še OCT6, OCT1 in OCT2, vendar s precej nižjo stopnjo izražanja (Gong in sod., 2002).

Metformin zaradi svojih fizikalno-kemijskih lastnosti v odvisnosti od mitohondrijskega membranskega potenciala vstopa v mitohondrije, kjer inhibira kompleks I elektronske prenašalne verige (Slika 3), tako *in vitro* kot *in vivo* (Wheaton in sod., 2014). Z analizo privzema metformina v mitohondrije celic osteosarkoma in hepatocelularnega karcinoma so pokazali, da do tega najverjetneje ne pride pasivno z difuzijo ampak posredovano s proteini (Bridges in sod., 2014). Kateri prenašalci bi naj bili odgovorni za prenos metformina prek mitohondrijske membrane, še ni znano. Bridges in sod. (2014) izpostavljajo dve študiji, z izsledki katerih bi lahko pojasnili aktiven privzem metformina v mitohondrije. V eni so pokazali prisotnost prenašalca organskih kationov/karnitina 1 (OCTN1) na mitohondriju (Lamhonwah in Tein, 2006, cit. po Bridges in sod., 2014), v drugi pa, da je ta transporter omogočil privzem fenformina v izolirane mitohondrije (Shitara in sod., 2014, cit. po Bridges in sod., 2014). Prav tako tudi natančen mehanizem interakcije metformina s kompleksom I še ni povsem pojasnjen (Pollak, 2012; Viollet in sod., 2012). Študija na izoliranih kompleksih I je pokazala, da je metformin reverzibilni ne-kompetitivni inhibitor, ki se veže na amfipatično regijo kompleksa I, ne glede ali je ubikinon nanj vezan ali ne (Bridges in sod., 2014). Izsledki te študije kažejo na to, da naj bi metformin z vezavo stabiliziral katalitično neaktivno konformacijo kompleksa I. Vstopanje metformina v mitohondrije je počasno, kar bi lahko bila posledica inhibicije kompleksa I dihalne verige, zaradi katere kompleks ne more več vzdrževati mitohondrijskega membranskega potenciala, ki pa je gonilna sila za vstop metformina (Bridges in sod., 2014).

#### *Raznolikost vpliva metformina na celice različnih vrst raka*

Učinki metformina na rakave celice različnih tkiv še zdaleč niso enaki, odvisni so namreč od njihovih metabolnih in genetskih lastnosti (Pollak, 2012). Delovanju metformina so precej bolj izpostavljene rakave celice, ki na svoji površini izražajo receptorje za inzulin in prenašalce OCT (Wheaton in sod., 2014). Pollak (2014) navaja, da naj bi bile na metformin bolj občutljive rakave celice z okvarami na kompleksih mitohondrijske dihalne verige (predvsem na kompleksu I). K tem bi lahko prispevale mutacije v mitohondrijski DNA z zapisom za komplekse elektronske prenašalne verige, ki so jih odkrili v celicah raka dojke in prostate (Wallace, 2012). Občutljivosti na metformin bi naj bile izpostavljene tudi celice

z neustreznim delovanjem AMPK, ki se zato ne bi uspele odzvati na energijski stres (Pollak, 2014). Zmanjšano stopnjo aktivacije AMPK v primerjavi z normalnim tkivom so odkrili v nekaterih tkivih raka dojke, kar bi lahko bila posledica mutacij v tumor supresorskem genu za LKB1 (Pollak, 2012).

#### *Metformin in HIF-1 $\alpha$*

Zaradi inhibicije kompleksa I z metforminom se zmanjša črpanje protonov prek notranje mitohondrijske membrane; s tem upade poraba molekularnega kisika in stopnja oksidacije NADH, kar skupno pripomore k padcu elektrokemijskega protonskega gradienta in ne nazadnje k zmanjšanju sinteze ATP (Bridges in sod., 2014). Kompleks I je pomembno mesto nastanka ROS, zato metformin zmanjša nastajanje ROS in oksidativni stres (Slika 3) (Emami Riedmaier in sod., 2013; Pollak, 2012; Wheaton in sod., 2014) ter zavira stabilizacijo HIF-1 $\alpha$  (Tadakawa in sod., 2015; Wheaton in sod., 2014). Tadakawa in sod. (2015) so dokazali, da metformin zniža HIF-1 $\alpha$  prek inhibicije mTORC1, ki regulira sintezo HIF-1 $\alpha$  na ravni translacije, na transkripcijo pa ne vpliva.

#### *Metformin in aktivnost mTORC1*

Povečano razmerje AMP/ATP in ADP/ATP spodbudi aktivacijo AMPK (Slika 3), ki metabolizem celice preusmeri iz anabolnega v katabolnega (Foretz in sod., 2014; Viollet in sod., 2012). Pod vplivom metformina se posredno, prek AMPK zmanjša sinteza maščobnih kislin in poveča njihova oksidacija, kar celici omogoči vzdrževanje NADPH (Jeon in sod., 2012). Zaustavitev sinteze proteinov, celične rasti in proliferacije so posledice inhibicije signalne poti mTORC1 (Slika 3) (Viollet in sod., 2012), ki je pri raku dojke konstitutivno aktivirana in povezana z visoko stopnjo napredovanja raka (Emami Riedmaier in sod., 2013). AMPK posreduje inhibicijo mTORC1 prek fosforilacije in aktivacije TSC2 (angl. »*Tuberous Sclerosis Complex protein 2*«), zaradi česar pride do inhibicije aktivnosti GTP-aze RHEB (angl. »*Ras homolog enriched in brain*«) (Slika 3), ki je sicer potrebna za aktivacijo mTORC1 (Emami Riedmaier in sod., 2013; Kalender in sod., 2010). AMPK lahko neodvisno od TSC2 inhibira mTORC1 s fosforilacijo in inhibicijo proteina Raptor (Slika 3), ki je z mTOR povezan regulatorni protein (Emami Riedmaier in sod., 2013; Kalender in sod., 2010). Kalender in sod. (2010) v svoji študiji razlagajo inhibitorni učinek metformina na mTORC1 na od AMPK neodvisen način. Do tega bi naj prišlo prek inhibicije Rag GTPaze (Slika 3), ki posledično ne more omogočiti prenosa mTORC1 na predel celice, kjer se nahaja RHEB, kar zmanjša njegovo aktivacijo (Kalender in sod., 2010).

Zaradi neučinkovite oksidativne fosforilacije in posledičnega upada ATP AMPK spodbuja aerobno glikolizo, da bi nadomestila izgubo ATP (Andrzejewski in sod., 2014; Hao in sod., 2010). Prek aktivacije p53 z AMPK bi naj metformin spodbujal zaustavitev celičnega cikla, ki v celicah z mutiranim p53, kot so MDA-MB-231, lahko vodi v programirano



celično smrt (Slika 3) (Emami Riedmaier in sod., 2013; Viollet in sod., 2012). Tadakawa in sod. (2015) so pokazali negativni učinek metformina na razvoj žil, saj je prek inhibicije mTORC1 signalne poti zavrl stabilizacijo HIF-1 $\alpha$  in tako preprečil izražanje gena za žilni endotelijski rastni dejavnik.

Z uporabo metformina bi lahko posredno, z aktivno AMPK spodbudili porabo glikolitičnih intermediatov za tvorbo ATP z glikolizo in posledično zaustavili z njimi povezane anabolne procese. Na ta način bi lahko z metforminom zaustavili proliferacijo celic raka dojke in zmanjšali tumor. Kljub številnim študijam, ki kažejo na antiproliferativni in pro-apoptotski učinek metformina na celice raka dojke MDA-MB-231 (Liu in sod., 2009; Marinello in sod., 2015), nekatere teh rezultatov niso potrdile (Zhuang in Miskimins, 2011).

### 2.3.1.1 Celice MDA-MB-231 kot model za preučevanje raka dojke

Celice trojno negativnega raka dojke z oznako MDA-MB-231 so predmet številnih raziskav za zdravljenje raka dojke. Te celice imajo mutacije v genu za tumor supresorski protein p53 in ne izražajo LKB1, ki aktivira AMPK (Zorodky in sod., 2014), zato naj bi imel metformin nanje močan citotoksičen učinek (Pollak, 2012). Na tej celični liniji so dokazali, da je učinek metformina odvisen od količine glukoze, ki je celicam na voljo (Zorodky in sod., 2014), od časa izpostavljenosti in koncentracije metformina (Marinello in sod., 2015). V celicah MDA-MB-231 so programirano celično smrt sprožile zelo visoke koncentracije metformina (1-40 mM) (Liu in sod. 2009), ki močno presegajo koncentracijo metformina v plazmi (7,5  $\mu$ M-13,5  $\mu$ M) sladkornega bolnika, ki dnevno prejema dozo 500-3000 mg metformina (Graham in sod., 2011). Liu in sod. (2009) so pokazali proti-rakav učinek metformina na celice raka dojke MDA-MB-231 tako *in vitro* kot tudi *in vivo*. Metformin je povečal raven fosforilirane AMPK, sprožil apoptozo in zaustavil proliferacijo ter tvorbo kolonij (Liu in sod., 2009). Tak učinek bi lahko bil posledica zaustavitve delovanja mitohondrijev, zmanjšanja tvorbe intermediatov Krebsovega cikla, kot so to dokazali Andrzejewski in sod. (2014) in upočasnitve z intermedianti povezanih anabolnih poti.

V eni od študij je metformin zaustavil celični cikel in sprožil apoptozo celic MDA-MB-231, kar so razložili kot posledico povečane ravni p53, do katere naj bi prišlo zaradi oksidativnega stresa, ki je poškodoval DNA (Marinello in sod., 2015). Zhuang in Miskimins (2011) sta na petih celičnih linijah raka dojke analizirala potek od kaspaz odvisno in neodvisno celično smrt, inducirano z 8 mM metforminom. Ugotovila sta, da na celično linijo MDA-MB-231 metformin ni imel citotoksičnega učinka, saj ni sprožil celične smrti niti po 4 dneh. Kot možen razlog za manjšo občutljivost celic navajata povečano aktivnost mitohondrijske superoksid dizmutaze v celicah MDA-MB-231, ki mitohondrije celic bolje varuje pred oksidativnimi poškodbami (Zhuang in Miskimins,

2011). Za vzdrževanje delovanja mitohondrijev je pomembna tudi učinkovita prepoznavna in odstranitev poškodovanih mitohondrijev z avtofagijo (Zhuang in Miskimins, 2011), kar regulira AMPK (Hardie, 2011). Celična linija MDA-MB-231, ki izraža LKB1 (Rajh in sod., 2016), ki aktivira AMPK, bi tako lahko bila manj občutljiva na metformin.

Zorodky in sod. (2014) so pokazali, da visoka koncentracija glukoze omeji antiproliferativni učinek metformina na celice trojno negativnega raka dojke. Rezultati preteklih analiz vpliva metformina na proliferacijo celic MDA-MB-231 v našem laboratoriju so prav tako pokazali odvisnost učinka metformina od koncentracije glukoze v mediju (Rajh in sod., 2016). Morda bi lahko k takemu rezultatu pripomogel okvarjen p53, ki zato ne more zavirati aerobne glikolize (Lu in sod., 2015). Celice z okvarjenim p53 imajo namreč višjo stopnjo glikolize in zmanjšano celično dihanje (Lu in sod., 2015), kar bi lahko veljalo tudi za MDA-MB-231, ki imajo okvarjen p53 (Zorodky in sod., 2014). Najverjetneje pa gre pri antiproliferativnem vplivu metformina za to, da imajo celice z zavrtim delovanjem mitohondrijev na voljo predvsem glukozo in če je te v mediju premalo, zapadejo v hudo energijsko krizo in propadejo (Rajh in sod., 2016).

Glede na izsledke obstoječih študij bi lahko sklepali, da je mehanizem, s katerim metformin zavira nastanek raka dojke pri bolnicah s sladkorno boleznijo tipa 2, posledica tako vpliva na sistemski ravni, kot tudi tarčnega delovanja v mitohondrijih celic, vendar to še ni bilo dokazano. Prav tako še ni jasno, kakšen je vpliv metformina na zaviranje raka dojke pri bolnicah, ki sicer nimajo sladkorne bolezni tipa 2. Nekatere študije so pokazale zgolj citostatični in ne citotoksični učinek metformina, kar bi pomenilo zaustavitev napredovanja bolezni, ne pa tudi njene regresije (Chiaradonna in sod., 2012). Neskladnost rezultatov različnih študij v razmerah *in vitro* bi lahko v prvi vrsti bila posledica ogromnih razlik v uporabljeni koncentraciji metformina in glukoze v mediju. V študijah uporabljene eksperimentalne koncentracije metformina so izjemno visoke in večinoma klinično neustrezne. Poleg tega lahko na rezultate študij v celičnih kulturah pomembno vpliva tudi prisotnost ali odsotnost fetusnega seruma goveda (angl. »fetal bovine serum«, FBS) v hranilnem mediju (Pirkmajer in Chibalin, 2011). Čeprav FBS zagotavlja dobre rastne razmere za celice, je njegova sestava zelo variabilna in slabo definirana, kar lahko vpliva tako na rezultate in njihovo razlago, kot tudi na ponovljivost poskusov. Pomanjkanje seruma v hranilnem mediju lahko v celicah sproži veliko različnih odzivov; najverjetneje zaradi pomanjkanja rastnih dejavnikov (Pirkmajer in Chibalin, 2011). Vsekakor je potrebno izpostaviti, da lahko že same eksperimentalne razmere privedejo do neskladnih ali celo nasprotnojuočih si rezultatov, kar lahko močno ovira primerljivost različnih študij (Pirkmajer in Chibalin, 2011).

### 2.3.2 Usmerjeno delovanje na proces glikolize

Zaradi fenomena aerobne glikolize je neposredna inhibicija glikolize dolgo veljala za obetaven pristop k zdravljenju raka (Chiaradonna in sod., 2012). Glikolizo lahko zavremo z uporabo učinkovin kot so 2-D-deoksiglukoza, dikloroacetat in oksamat.

2-D-deoksiglukoza je sintetični analog glukoze, ki po vstopu v celice prek glukoznega prenašalca zaustavi glikolizo. Heksokinaza fosforilira 2-D-deoksiglukozo, s čemer celica porablja ATP. Ker se presnova fosforilirane 2-D-deoksiglukoze v glikolitični poti ne nadaljuje, se ta nakopiči v celici, kjer inhibira heksokinazo, prepreči nastajanje ATP in laktata, kar vodi v zaustavitev rasti celic in celično smrt (Zhang in sod., 2016). Dikloroacetat je metabolni regulator, ki negativno vpliva na rast rakavih celic, saj preusmeri metabolizem iz glikolitičnega v oksidativnega. Z inhibicijo piruvat dehidrogenaze kinaze, ki je negativni regulator piruvat dehidrogenaze (Slika 1), preusmeri piruvat v Krebsov cikel (Bonnet in sod., 2007; Chiaradonna in sod., 2012). Zaradi spodbujene oksidativne fosforilacije se poveča poraba kisika in nastanek ROS, mitohondrijski membranski potencial se zmanjša, glikoliza in tvorba laktata pa sta zavrti (Bonnet in sod., 2007). Dikloroacetat naj bi celično smrt sprožil prek depolarizacije mitohondrijev rakavih celic, ki so v osnovi hiperpolarizirani (Bonnet in sod., 2007; Stockwin in sod., 2010). Strukturni analog piruvata oksamat (Martin-Requero in sod., 1986) se kompetitivno veže in inhibira laktat dehidrogenazo (Yang in sod., 2014; Zhai in sod., 2013; Zhao in sod., 2015) ter tako prepreči pretvorbo piruvata v laktat. Ugotovili so, da ima oksamat na različne rakave celice, tudi na celice raka dojke (Zhai in sod., 2013), podoben vpliv. Ker prekine aerobno glikolizo, v Krebsov cikel vstopi več piruvata, kar močno poveča količino ROS, ki spodbujajo celično smrt. Celični cikel in proliferacija celic se zaustavita, saj pride zaradi zmanjšanja ATP do inhibicije signalne poti PI3K/Akt/mTORC1 (Yang in sod., 2014; Zhai in sod., 2013; Zhao in sod., 2015). Čeprav so inhibitorji glikolize pokazali terapevtski potencial tako *in vitro* kot *in vivo*, je njihova uporaba zelo omejena, ker so toksični za normalna tkiva, predvsem za možgane (Chiaradonna in sod., 2012).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 CELIČNI LINIJI MDA-MB-231 IN PC-3

##### 3.1.1 Celični liniji raka dojke in raka prostate

Naš eksperimentalni model so bile človeške celice MDA-MB-231, ki izvirajo iz adenokarcinoma dojke. So epiteljske celice vretenaste oblike, ki rastejo prilepljene na podlago. Izolirali so jih iz metastaz v prsni mreni 51 let stare bolnice. So agresivne, invazivne, trojno negativne celice z mutacijo v tumor-supresorskem genu za p53 (ATCC®CRM-HTB-26, 2014; ATCC: Triple Negative..., 2016). Sposobne so tvoriti kolonije na agarozni, kar je pokazatelj transformiranosti in tumorigenosti. *In vivo* v golih miših tvorijo tumorje in metastaze (MDA-MB..., 2015).

Kot primerjalni eksperimentalni model smo uporabili celično linijo PC-3, ki izvira iz adenokarcinoma prostate. Celice so izolirali iz metastaz v kosti 62-letnega bolnika. So epiteljske celice, ki običajno rastejo prilepljene na podlago, lahko pa se prilagodijo na rast v suspenziji. V mehkem agarju tvorijo gručice, *in vivo* v golih miših pa tumorje. Zanje je značilna nizka aktivnost kisle fosfataze in testosteron-5-alfa reduktaze (ATCC®CRL-1435, 2014).

##### 3.1.2 Gojenje

Vse poskuse smo izvajali na celični liniji raka dojke z oznako MDA-MB 231 (ATCC) in na celični liniji raka prostate z oznako PC-3 (ATCC). Obe celični liniji smo gojili v hranilnem mediju RPMI 1640 z minimalno sestavo (Genaxxon BioScience, Nemčija) z dodanim 10 % FBS (Gibco, Maryland, ZDA), 2 mM glutaminom (Sigma-Aldrich, Nemčija) in 1 g/L glukoze. Za nekatere poskuse smo uporabili RPMI 1640 z dodanim 2 mM glutaminom in 1 g/L glukoze, brez FBS. Celice smo gojili v gojitvenih posodah za celične kulture s površino 75 cm<sup>2</sup> in v mikrotitrskih ploščah z 12 ali 24 jamicami (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija), v inkubatorju (Heraeus, Nemčija) s temperaturo 37 °C, v atmosferi z nasičeno vodno paro, 5 % CO<sub>2</sub> in 20 % O<sub>2</sub>.

##### 3.1.3 Presajanje

Celice smo presajali pri 80- do 90-odstotni konfluentnosti, ki smo jo določili s pregledom gojitvene posode pod invertnim mikroskopom Zeiss Axiovert 25, HB050. Iz posode smo odsesali medij, celice sprali s fosfatnim pufrom s fiziološko raztopino (PBS) in dodali segreto raztopino tripsina (Gibco, Thermofisher Scientific, ZDA). Celice smo ustrezno dolgo inkubirali, da so se odlepili od podlage in nato tripsinizacijo ustavili s hranilnim medijem RPMI z 2 mM glutaminom, 1 g/L glukoze in 10 % FBS. Število celic smo določali s hemocitometrom (Blaubrand, Nemčija) in jih naprej presajali v zelenih koncentracijah.

### 3.1.4 Shranjevanje v tekočem dušiku

Celice nizkih pasaž smo uporabili za pripravo dodatnih celičnih zalog. Suspenzijo celic smo centrifugirali 5 minut pri 1000 rpm. Po končanem centrifugiranju smo odesali supernatant in pelet celic dobro resuspendirali v mediju RPMI z 1 g/L glukoze, 2 mM glutaminom, 10 % FBS in s 5 % dimetil sulfoksidom (DMSO) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija), ki celice ščiti pred nastankom poškodb ob zamrzovanju. Po 1 ml tako pripravljene suspenzije smo prenesli v zamrzovalne plastične posodice (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija), jih ustrezno označili (celična linija, pasaža, datum, ime) in prestavili v komoro za nadzorovano zamrzovanje (Bioblock Scientific, Francija). Komora vsebuje izopropilni alkohol, ki v zamrzovalniku s temperaturo -80 °C (Fryka-Kältetechnik Esslinger, Nemčija) omogoča počasno ohlajanje po 1 °C/minuto. Po nekaj dneh smo zamrzovalne posodice prestavili v tekoči dušik, kjer smo jih dolgoročno shranili.

### 3.1.5 Odmrzovanje

Po potrebi smo iz tekočega dušika vzeli zamrzovalno posodico s celicami in suspenzijo čim hitreje (približno 2 minuti) odtalili v vodi iz tople kopeli (VWR Scientific, ZDA). Zamrzovalno posodico smo popršili s 70 % etanolom in jo prestavili v laminarij (Iskra Pio, Slovenija), kjer smo celice aseptično resuspendirali in jih prenesli v hranilni medij RPMI z 1 g/L glukoze, 2 mM glutaminom in 10 % FBS v gojitveni posodi. Po 24 urah smo medij zamenjali s svežim, da smo odstranili DMSO. Celice smo ustrezno dolgo gojili in jih nato v odvisnosti od njihove gostote ali presadili ali pa uporabili za poskuse.

## 3.2 UČINKOVINE

Preglednica 1: Pregled uporabljenih učinkovin

Učinkovina	Koncentracija založne raztopine	Topilo	Uporabljena koncentracija
*Metformin	500 mM	PBS	30 µM, 100 µM, 300 µM, 1 mM, 5 mM
**Oksammat	500 mM	PBS	10 mM, 20mM
**Dikloroacetat	1 M	PBS	10 mM
**Oligomicin A	10 mM	voda	5 µM
**NaCN	1 M	voda	5 mM, 10mM
**CoCl <sub>2</sub>	250 mM	voda	250 µM
**FCCP	1 mM 40 mM	DMSO	0,5 µM 40 µM

\*Proizvajalec je Calbiochem, Kalifornija, ZDA

\*\*Proizvajalec je Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija

### 3.3 OPREMA

Preglednica 2: Pregled uporabljene opreme

Oprema	Proizvajalec	Uporaba
Mikroskop Zeiss Axiovert 25, HB050	Zeiss, Švedska	Pregled in štetje celic
Centrifuga 5804R Victor 3	Ependorf, Nemčija PerkinElmer, ZDA	Centrifugiranje za odstranitev supernatanta Meritev fluorescence Hoechst (ex355-em450 nm), meritev BCA (550 nm), meritev absorbance fumarazne aktivnosti (450 nm)
Tecan Infinite 200	Tecan Group	Meritev fluorescence Hoechst
Pretočni citometer CyFlow Space	Partec, Nemčija	Analiza mitohondrijskega membranskega potenciala z barvilom TMRM
Tehtnica AB54-S	Mettler Toledo, Švica	Tehtanje učinkovin za pripravo založnih raztopin
Sonifikator	Hielscher, Nemčija	Homogeniziranje vzorcev za prenos Western
Denzitometer GS-800	BioRad, Hercules, ZDA	Analiza filmov prenosa Western
Epoch	BioTek Instruments, ZDA	Meritev absorbance za analizo laktata (570 nm)
BioRad Criterion Cell	BioRad Laboratories Inc., Hercules, ZDA	Elektroforeza
BioRad Criterion Blotter	BioRad Laboratories Inc., Hercules, ZDA	Prenos beljakovin iz gela na membrano
Curix 60	Agfa Healthcare, ZDA	Razvijanje filmov

### 3.4 MERJENJE MITOHONDRIJSKEGA MEMBRANSKEGA POTENCIALA Z BARVILOM TMRM

Fluorescentno lipofilno kationsko barvilo tetrametilrodamin metil (TMRM) omogoča posredno meritev mitohondrijskega membranskega potenciala. Njegovo kopičenje v notranjosti mitohondrija je namreč odvisno od polarizacije mitohondrija (Perry in sod., 2011). Nakopičenje fluorescentnega barvila smo optično zaznali s CyFlow Space pretočnim citometrom (Partec, Nemčija).

Celice MDA-MB-231 in PC-3, ki smo jih uporabili za analizo vpliva modulatorjev energijske presnove na mitohondrijski membranski potencial, smo predhodno nasadili v gojitvene posode za celične kulture s površino 75 cm<sup>2</sup> in jih 48 ur gojili v mediju RPMI z 1 g/L glukoze, 2 mM glutaminom in 10 % FBS. Celice MDA-MB-231, ki smo jih uporabili za analizo vpliva metformina na mitohondrijski membranski potencial, smo nasadili v mikrotitrne plošče z 12 jamicami v medij RPMI z 1 g/L glukoze, 2 mM glutaminom in 10 % FBS ter jih 24 ur tretirali z 0 mM, 0,03 mM, 0,3 mM ali 5 mM metforminom. Po 24 oziroma 48 urah smo iz mikrotitrskih plošč oziroma gojitvenih posod odsesali medij, vanje

odpipetirali medij RPMI z 1 g/L glukoze, 2 mM glutaminom, 10 % FBS in dodanim 200 nM TMRM (Invitrogen, ZDA) ter celice inkubirali 30 minut pri 37 °C. Po končani inkubaciji s TMRM smo celice tripsinizirali in pripravili suspenzijo, ki smo jo nato 8 minut centrifugirali na 1200 rpm. Supernatant smo odstranili, pelet celic pa resuspendirali v zadostni količini PBS z 1 g/L glukoze, 10 mM HEPES (Sigma, Nemčija), 2 mM glutaminom in 1% FBS. Po 1 ml suspenzije še ne tretiranih celic MDA-MB-231 in PC-3 v PBS smo prenesli v polietilenske epruvetke za pretočni citometer in dodali ustrezno količino določenega modulatorja energijskega metabolizma. V suspenzije smo dodali 10 mM oksamat, 20 mM oksamat, 10 mM dikloroacetat, 5 µM oligomicin, 10 mM NaCN, 5 µM oligomicin + 10 mM NaCN in 40 µM FCCP. Eno skupino celic smo določili za kontrolo, zato v suspenzijo nismo dodali učinkovine, ampak samo topilo (vodo, PBS ali DMSO). Celice smo tretirali 40 minut na sobni temperaturi in nato s pretočnim citometrom pomerili intenziteto fluorescence TMRM posameznega vzorca celic. V eno od suspenzij celic MDA-MB-231, ki smo jih 24 ur tretirali z različnimi koncentracijami metformina, smo dodali 40 µM FCCP in nato po 40 minutah pomerili fluorescenco TMRM v vseh vzorcih. Podatke, ki smo jih dobili s CyFlow Space pretočnim citometrom, smo analizirali s programom FlowJo (FlowJo software, ZDA).

### 3.5 MERJENJE AKTIVNOSTI FUMARAZE

Fumarazno aktivnost smo določili s »*Fumarase Activity Colorimetric Assay Kit*« (BioVision, ZDA). Test temelji na pretvorbi fumarata v malat z aktivno fumarazo (fumarat hidratazo) celic. Nastali malat nato reagira z encimsko mešanico, da nastane intermediat, ki reducira razvijalec v obarvan produkt z močno absorbanco pri 450 nm. S tem testom lahko detektiramo fumarazno aktivnost manjšo od 50 U/ml (Fumarase Activity Colorimetric Assay Kit, 2015).

Za ta poskus smo uporabili MDA-MB-231 in PC-3 celice, ki smo jih nasadili v mikrotitrne plošče z 12 jamicami, v katerih smo celice gojili 24 ur v hranilnem mediju RPMI z 1 g/L glukoze, 2 mM glutaminom in 10 % FBS. Po 24 urah smo odsesali hranilni medij in v jamice dodali po 1 ml medija RPMI z 1 g/L glukoze, 2 mM glutaminom in 10 % FBS, z dodanimi ustreznimi učinkovinami (5 mM metformin, 10 mM dikloroacetat, 10 mM oksamat in 0,5 µM FCCP v DMSO in DMSO). Eno skupino celic smo določili za kontrolo in zato v te jamice nismo dodali učinkovin. Celice smo tretirali 24 ur pri 37 °C. Po 24 urah smo izmerili fumarazno aktivnost po navodilih proizvajalca kompleta »*Fumarase Activity Colorimetric Assay Kit*« (BioVision, ZDA). Aktivnost smo normirali na maso celokupnih beljakovin, ki smo jo izračunali iz koncentracije celokupnih beljakovin in volumna 0,03 % SDS. Koncentracijo celokupnih beljakovin smo izmerili s

testom BCA (*Pierce™ BCA Protein Assay Kit*) v skladu z navodili proizvajalca (ThermoFisher Scientific, ZDA).

### 3.6 DOLOČANJE KONCENTRACIJE LAKTATA

Koncentracijo laktata v vzorcih medija smo določili z encimskim testom »*Lactate Assay Kit*« po navodilih proizvajalca (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA). Pri tem testu nastane kolorimetrično zaznavni produkt, ki je proporcionalen koncentraciji laktata v vzorcu. Produkt smo zaznali pri valovni dolžini 450 nm.

Poskus smo izvedli na celicah MDA-MB-231 in PC-3. Celice smo nasadili v mikrotitrne plošče s 24 jamicami, v katerih smo celice gojili 24 ur v mediju RPMI z 1 g/L glukoze, 2 mM glutaminom in 10 % FBS. Po 24 urah smo iz jamic odsesali medij, celice dvakrat sprali s PBS in dodali hranilni medij RPMI z 1 g/L glukoze, 2 mM glutaminom in brez FBS z ustreznimi učinkovinami ali brez učinkovine za kontrolno skupino. Po dodatku hranilnega medija z ustreznimi učinkovinami (10 mM oksamat, 10 mM dikloroacetat, 5 mM metformin, 5 mM NaCN, 250  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>, metformin + NaCN in metformin + CoCl<sub>2</sub>) smo plošče prestavili v inkubator, kjer smo celice gojili 24 ur. Po 24 urah smo iz posameznih jamic odpipetirali po 400  $\mu$ l medija v ustrezno označene mikrocentrifugirke. Medij smo 4 min centrifugirali in nato po 350  $\mu$ l medija iz vsake prenesli v novo mikrocentrifugirko.

Preostanek medija v jamicah smo odsesali in vanje dodali po 125  $\mu$ l 0,03 % natrijevega dodecil sulfata (SDS) (Sigma-Aldrich, Nemčija). Celice smo lizirali 45 minut na stresalniku pri sobni temperaturi in nato lizate uporabili za določitev koncentracije proteinov z BCA in za Hoechst analizo, s katero smo določili vpliv učinkovin na preživetje (število) celic.

### 3.7 DOLOČANJE SIGNALNIH POTI AMPK-ACC IN HIF-1 $\alpha$ S PRENOSOM (ODTISOM) WESTERN

Prenos western (ang. »*Western blot*«) je metoda, s katero detektiramo specifične beljakovine v vzorcih tkiv ali celičnih kultur. Metodo smo uporabili za določanje fosforilirane oblike AMPK (pAMPK), fosforilirane oblike encima ACC (pACC) in HIF-1 $\alpha$ . V vzorcih celičnih kultur MDA-MB-231 in PC-3 smo določili še dve endogeni kontroli, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazo (GAPDH) in aktin.

Celice celične linije MDA-MB-231 in PC-3, katerih vsebnost proteinov smo želeli določiti s prenosom western, smo nasadili v mikrotitrne plošče z 12 jamicami in jih ustrezno dolgo



(24 ali 48 ur, odvisno od začetnega števila celic) gojili v mediju RPMI z 1 g/L glukoze, 2 mM glutaminom in 10 % FBS. Pred začetkom tretiranja smo hranilni medij odsesali, celice sprali s PBS in nato v jamice odpipetirali po 1 ml medija RPMI z 1 g/L glukoze, 2 mM glutamin in brez FBS, z dodanimi učinkovinami v ustrezni koncentraciji. Celice smo izpostavili 5 mM metforminu, 10 mM oksamatu, 10 mM dikloroacetatu, 5 mM NaCN, 250  $\mu$ M  $\text{CoCl}_2$  ali kombinacijama metformin + NaCN ali metformin +  $\text{CoCl}_2$ . Plošče s celicami smo prestavili v inkubator, kjer je tretiranje potekalo 24 ur. Po končanem tretiranju smo plošče s celicami takoj prestavili na led, odsesali medij in jih 3-krat sprali z ledeno hladnim PBS.

### 3.7.1 Priprava vzorcev

Celice smo na ledu lizirali z  $1\times$  Laemmelijskim pufrom. S plastičnimi strgali (Greiner Bio-One, Nemčija) smo Laemmelijski pufer enakomerno razmazali po celotni površini jamic s celicami in lizate prenesli v mikrocentrifugirke. Vzorce smo homogenizirali s sonifikatorjem in jih za 20 minut prestavili v stresalnik na 56 °C (Eppendorf, Nemčija), da smo denaturirali proteine.

Laemmelijski pufer vsebuje vodo, Tris-HCl, bromofenol modro, natrijev dodecil sulfat (SDS),  $\beta$ -merkaptetanol in glicerol (Preglednica 3). Bromofenol modro je barvilo, ki vzorce obarva ter tako omogoči lažji nanos v jamice gela in opazovanje potovanja beljakovin v gelu. SDS je anionski detergent, ki denaturira beljakovine, z vezavo na njihove polipeptidne vezi pa jim dodeli negativen naboj in tako omogoči ločevanje beljakovin zgolj po velikosti.  $\beta$ -merkaptetanol reducira disulfidne vezi znotraj molekul in med molekulami. Glicerol poveča gostoto vzorcev, zato da se ti lažje zberejo na dnu jamic gela in se iz njih ne izgubljajo (Laemmli  $2\times$  Concentrate, 2016).

Preglednica 3: Sestava  $1\times$  Laemmelijskega pufera

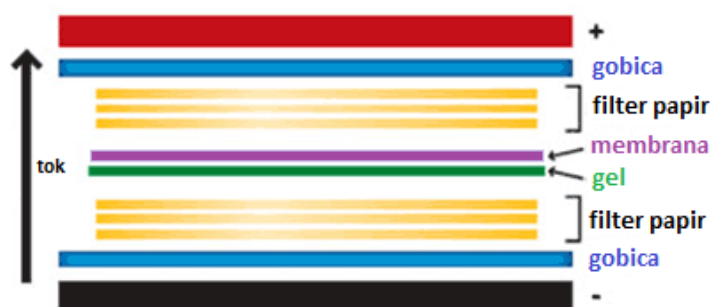
*Kemikalija	Količina (za 50 ml)	Enota	Koncentracija
Tris baza	378,45	mg	62,5 mM
SDS	1	g	2 %
Glicerol	5	g	10 %
Destilirana voda	5	ml	
Bromofenol modro	1	mg	0,002 %
$\beta$ -merkaptetanol	2,5	ml	
Destilirana voda		do 50 ml	

\*Proizvajalec vseh kemikalij je Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija

### 3.7.2 Gelska elektroforeza in prenos na membrano

Vzorci smo nanesti na poliakrilamidne gele z 18 žepki (BioRad, Hercules, ZDA), ki smo jih namestili v elektroforezni sistem BioRad Criterion Cell. Pred nanosom vzorcev smo v elektroforezni sistem nalili 1× pufer za ločevanje proteinov, ki smo ga z redčenjem pripravili iz 20× pufera »XT MES Running Buffer« (BioRad Laboratories Inc., ZDA). V prvi in zadnji žepki smo nanesti velikostni marker »Full Range Rainbow Protein Molecular Weight Marker« (RPN800E, GE Healthcare, ZDA). Elektroforeza je potekala približno 50 minut pri konstantni napetosti 200 V.

Po končani elektroforezi smo na gel položili v 100 % metanolu aktivirano poliviniliden difluoridno (PVDF) membrano Immobilon-P, s porami velikosti 0,45 µm (Millipore Corporation, ZDA). V kaseti smo sestavili sendvič (Slika 4) za prenos beljakovin iz gela na membrano, tako da smo membrano in gel obdali s filter papirjem in gobicami (Slika 4), ki smo jih pred tem namočili v 1× pufru za prenos (Preglednica 4). Kaseto smo pazljivo zaprli, da se plasti sendviča ne bi razmaknile, in kaseto položili v aparat za prenos BioRad Criterion Blotter, v katerega smo nalili 1× pufer za prenos. Prenos je potekal 60 minut pri konstantni napetosti 100 V. Ker se pri tem sprošča veliko toplote, smo aparat obdali z veliko ledu, da se ne pregreje.



Slika 4: Shema sendviča za prenos proteinov iz gela na membrano (General western blot protocol, 2016: 4)

Preglednica 4: Sestava 10× Tris glicinskega pufera za prenos (1 L)

*Kemikalija	Količina	Enota
Tris baza	37,9	g
Glicin	180,2	g
Destilirana voda	do 1 L	

\*Proizvajalec vseh kemikalij je Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija

### 3.7.3 Barvanje z barvilom Ponceau S

Po končanem prenosu smo membrano najprej sprali v pufru TBST (angl. »Tris Buffered Saline with Tween«) (Preglednica 5) in nato v 5 % očetni kislini. Membrano smo nato 5 minut inkubirali v barvilu Ponceau S (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija). Po tem času smo opazili rdeče obarvanje beljakovin v pasovih in rožnato obarvanje membrane. Membrano smo sprali v 5 % očetni kislini in s tem odstranili rožnato ozadje, pasovi beljakovin pa so postali lepše vidni. Membrano smo skenirali na barvnem skenerju. S pomočjo velikostnih standardov smo membrano prerezali na ustrezno široke trakove, kjer smo predvideli, da bodo iskani proteini pAMPK, pACC, HIF-1 $\alpha$ , GAPDH in aktin.

Preglednica 5: Sestava 20 $\times$  pufru TBST

Kemikalija	Količina	Enota
*Tris baza	48,4	g
*NaCl	800	g
**1M HCl	24	ml
Destilirana voda	do 1	L

\*Proizvajalec Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija

\*\*Proizvajalec Merck KGaA, Nemčija

### 3.7.4 Blokiranje membrane

Ponceau S smo s trakov odstranili s spiranjem v pufru TBST. Membrane smo nato namočili v 100 % metanol in jih posušili do suhega, s čemer smo zagotovili uspešnejše blokiranje. Sledila je ponovna aktivacija z metanolom in spiranje v pufru TBST.

V pufru TBST smo raztopili nemastno mleko v prahu (Pomurske mlekarne, Ljutomer, Slovenija) in si pripravili raztopino 7,5 % nemastnega mleka za blokiranje membrane. Membrane smo v 7,5 % mleku inkubirali 1 uro na stresalniku z namenom, da bi preprečili vezavo primarnih protiteles na nespecifična vezavna mesta na membrani (Blocking Buffers for..., 2015).

### 3.7.5 Inkubacija s primarnimi in sekundarnimi protitelesi

Trakove membran smo sprali v pufru TBST, jih prenesli v vrečke in vanje odpipetirali ustrezna primarna protitelesa (Preglednica 6). Inkubacija s primarnimi protitelesi je potekala čez noč na stresalniku v hladni sobi pri 4 °C.

Preglednica 6: Primarna protitelesa

Protitelo	Proizvajalec	Vir (species)
GAPDH sc25778	Santa Cruz Biotechnologies, ZDA	kunec
Actin (I-19)-R sc1616-R Rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnologies, ZDA	kunec
pAMPK $\alpha$ (T172)(40H9) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, ZDA	kunec
pACC (S79) Ab	Cell Signaling Technology, ZDA	kunec
HIF-1 $\alpha$ Ab (NB100-449)	Novus Biologicals, ZDA	kunec

Nemastno mleko v prahu in pufer TBST smo uporabili za pripravo 5 % nemastnega mleka, v katerem smo ustrezno redčili sekundarna protitelesa (BioRad, Hercules, Kalifornija, ZDA). Po končani inkubaciji s primarnimi protitelesi smo membrane večkrat sprali v pufru TBST in jih nato kratko (20 minut) blokirali v 5 % nemastnem mleku. To mleko smo odlili, na membrane nalili 5 % nemastno mleko z ustrezno redčenimi sekundarnimi protitelesi in membrane 1 uro inkubirali na stresalniku na sobni temperaturi.

### 3.7.6 Detekcija z ojačano kemiluminiscenco

Pasove beljakovin, ki smo jih predvideli na določenem traku membrane, smo zaznali z metodo imenovano ojačana kemiluminiscenca (angl. »*enhanced chemiluminescence*« - ECL). Membrane smo osušili na robčkih KimWipes (Kimberly-Clark, ZDA) in pripravili kemiluminiscentna reagentna, ki smo ju zmešali šele tik pred uporabo. Reagent 1 vsebuje peroksid, reagent 2 pa luminol (Thermo scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA). Mešanico reagentov smo nakapali na membrane in inkubirali 1 minuto.

Uporabljena sekundarna protitelesa so konjugirana s hrenovo peroksidazo, ki katalizira reakcijo oksidacije luminola s peroksidom, da nastane 3-aminoftalat. Pri prehodu v osnovno energijsko stanje 3-aminoftalat odda svetlobo valovne dolžine 425 nm (Chemiluminescent Western Blotting, 2015), ki smo jo zajeli na rentgenski film (Agfa, Zagreb, Hrvaška). Filme smo razvili v napravi za razvijanje rentgenskih filmov Curix 60, jih ustrezno označili (oznaka poskusa, velikostni markerji, detektirani proteini, čas ekspozicije filma membrani, datum, avtor), analizirali na denzitometru in shranili. Membrane smo sprali v pufru TBST, jih osušili do suhega in jih shranili v zamrzovalnik na -20 °C.

Na trakovih membrane, kjer smo zaznali GAPDH (40,2 kDa), smo želeli detektirati še aktin (42 kDa). Po končani ECL smo membrane sprali v pufru TBST, jih posušili do suhega in nato znova aktivirali v 100 % metanolu. Membrane smo nato 50 minut inkubirali v 7,5 % nemastnem mleku. Sledila je inkubacija s primarnimi in sekundarnimi protitelesi ter detekcija po zgoraj opisanem postopku. Pred inkubacijo membran s primarnimi protitelesi za aktin protiteles za GAPDH nismo odstranili, saj smo se želeli izogniti poškodbam membran.

### 3.8 DOLOČANJE ŠTEVILA CELIC MDA-MB-231 IN PC-3 Z BARVILOM HOECHST

Hoechst 33342 (Molecular Probes, ZDA) je fluorescentno barvilo, ki se specifično veže na dvo-verižno DNA (preferenčno na bazne pare A-T). Po vzbujanju s svetlobo valovne dolžine 355 nm na DNA vezan Hoechst odda modro fluorescenčno svetlobo z emisijskim maksimumom pri 461 nm (Hoechst 33342 Solution, 2014). Z uporabo barvila Hoechst smo posredno določali število celic. Na ta način smo ugotavljali, ali je neka določena učinkovina oziroma kombinacija tretirnih parametrov vplivala na proliferacijo celic in posledično na velikost njihove populacije.

Celice smo nasadili na mikrotitrne plošče s 24 jamicami in jih 24 ur gojili v mediju RPMI z 1 g/L glukoze, 2 mM glutaminom in 10 % FBS. Po 24 urah smo iz jamic odsesali medij, po potrebi celice sprali s PBS in vanje dodali medij z izbranimi učinkovinami, katerim smo celice izpostavili poljubno dolgo. Tretiranje celic je potekalo v inkubatorju z normoksičnimi razmerami (5% CO<sub>2</sub>, 20 % O<sub>2</sub>), pri 37 °C. Po koncu tretiranja smo iz jamic odsesali medij in vanje dodali 0,03% SDS, s katerim smo celice lizirali. Nastale lizate smo prenesli v jamice 96- mestne mikrotitrne plošče in v razmerju 1:1 dodali pufer Tris-NaCl (50 mM Tris in 100 mM NaCl) s Hoechstom v koncentraciji 5 µg/ml. Ploščo smo 10 minut inkubirali v temi pri sobni temperaturi in nato pomerili fluorescenco Hoechst z aparaturama Victor ali Tecan.

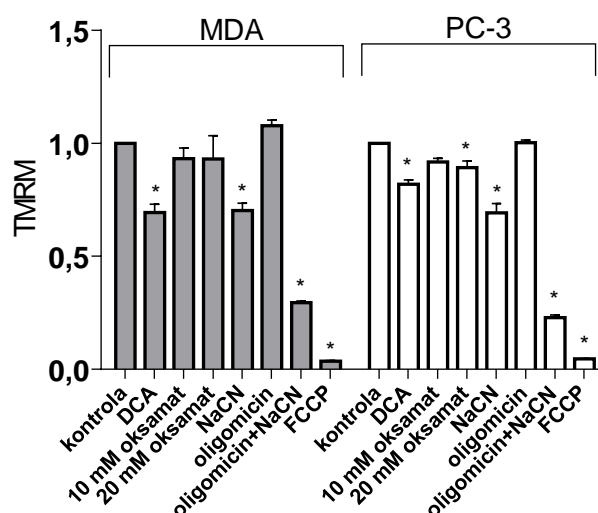
### 3.9 STATISTIČNE METODE

Rezultate smo statistično analizirali s programom GraphPad Prism 6. Za primerjavo razlik med posameznimi vzorci s kontrolnim vzorcem smo uporabili enosmerno analizo variance (enosmerna ANOVA) in Dunnettov *post hoc* test s stopnjo zaupanja 95 % ( $p < 0,05$ ). Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti s standardno napako povprečja (SEM). Oznaka \* pomeni statistično značilno razliko. Za primerjavo med več skupinami smo uporabili enosmerno ANOVO in Bonferronijev *post hoc* test s stopnjo zaupanja 95 % (\* $p < 0,05$ ). Oznaka N pomeni število neodvisnih izvedb poskusa, oznaka n pa število vseh bioloških ponovitev upoštevanih v rezultatih.

## 4 REZULTATI Z RAZPRAVO

### 4.1 VPLIV MODULATORJEV ENERGIJSKE PRESNOVE NA MITOHONDRIJSKI MEMBRANSKI POTENCIAL IN AKTIVNOST FUMARAZE V CELICAH RAKA DOJKE MDA-MB-231 IN RAKA PROSTATE PC-3

Pred poskusi z metforminom smo ovrednotili delovanje mitohondrijev v celicah MDA-MB-231. Delovanje mitohondrijev smo ocenili posredno in sicer z uporabo fluorescenčnega barvila TMRM, ki vstopa v mitohondrije v odvisnosti od njihovega membranskega potenciala (Perry in sod., 2011). S TMRM smo analizirali mitohondrijski membranski potencial celic MDA-MB-231 po 40-minutni izpostavitvi oksamatu (inhibitorju glikolize), dikloroacetatu (posrednemu aktivatorju piruvat dehidrogenaze), NaCN (inhibitorju kompleksa IV) in oligomicinu (inhibitorju kompleksa V) (Slika 5). Da bi ugotovili, ali so odzivi mitohondrijev različnih rakavih celic podobni, smo poskus izvedli še na PC-3 celicah.



**Slika 5: Mitohondrijski membranski potencial celic MDA-MB-231 in PC-3 po 40 minutah tretiranja z različnimi modulatorji energijske presnove.** Celice smo 40 minut tretirali v PBS, ki je vseboval 1 g/L glukoze, 10 mM HEPES, 2 mM glutamin in 1 % FBS. Celice smo tretirali z 10 mM DCA, 10 mM in 20 mM oksamatom, 10 mM NaCN, 5  $\mu$ M oligomicinom in 40  $\mu$ M FCCP. Odklopnik FCCP smo uporabili kot pozitivno kontrolo. Prikazane so povprečne vrednosti ( $\pm$ SEM) fluorescence TMRM. N=3. \* $p$ <0,05 v primeravi s kontrolo, ANOVA in Dunnettov *post hoc* test. DCA: dikloroacetat.

V obeh celičnih linijah so upad fluorescence TMRM, ki kaže na depolarizacijo mitohondrijev, povzročili dikloroacetat, NaCN in oligomicin v kombinaciji z NaCN. 10 mM dikloroacetat je v našem poskusu po 40 minutah povzročil upad mitohondrijskega membranskega potenciala tako pri celicah MDA-MB-231 kot tudi pri celicah PC-3 (Slika

5). Podobne rezultate so dobili Bonnet in sod. (2007), ki navajajo, da je že 0,5 mM dikloroacetat po 5 do 10 minutah povzročil padec mitohondrijskega membranskega potenciala hiperpolariziranih mitohondrijev celic nedrobnoceličnega raka pljuč, glioblastoma in za estrogenske receptorje pozitivnega raka dojke (celice MCF-7). Dikloroacetat inhibira piruvat dehidrogenazo kinazo, ki je negativni regulator piruvat dehidrogenaze, in tako preusmeri piruvat v Krebsov cikel (Bonnet in sod., 2007; Chiaradonna in sod., 2012). Na ta način spodbudi delovanje mitohondrijev, posledično poveča tvorbo ROS, zmanjša nastajanje laktata in depolarizira mitohondrijski membranski potencial rakavih celic (Bonnet in sod., 2007; Stockwin in sod., 2010).

Tako kot dikloroacetat je tudi 10 mM NaCN povzročil depolarizacijo mitohondrijske membrane v obeh celičnih linijah (Slika 5). NaCN je inhibitor kompleksa IV dihalne verige (Martínez-Reyes in sod., 2016; Wyatt in Buckler, 2004). Podoben vpliv NaCN na mitohondrije celic I podganjih karotidnih teles navajata Wyatt in Buckler (2004), pri katerih je NaCN povzročil hitro depolarizacijo mitohondrijske membrane in hiter dvig koncentracije kalcija v citosolu. Bonnet in sod. (2007) so z uporabo 5  $\mu$ M cianida ugotovili, da ta za razliko od dikloroacetata ne vpliva na mitohondrijski membranski potencial celic nedrobnoceličnega raka pljuč. S tem rezultatom so nakazali, da naj bi bile rakave celice manj odvisne od funkcionalne dihalne verige in oksidativne fosforilacije (Bonnet in sod., 2007). Vzrok, zakaj 5  $\mu$ M cianid ni imel vpliva na mitohondrijski membranski potencial, je najverjetneje prenizka koncentracija uporabljenega cianida. Za popolno inhibicijo prenosa elektronov je namreč potrebno uporabiti visoke koncentracije cianida (mM vrednosti), saj je cianid v puferskih raztopinah izpostavljenih zraku izjemno hlapen in se izgublja v obliki HCN (Wyatt in Buckler, 2004).

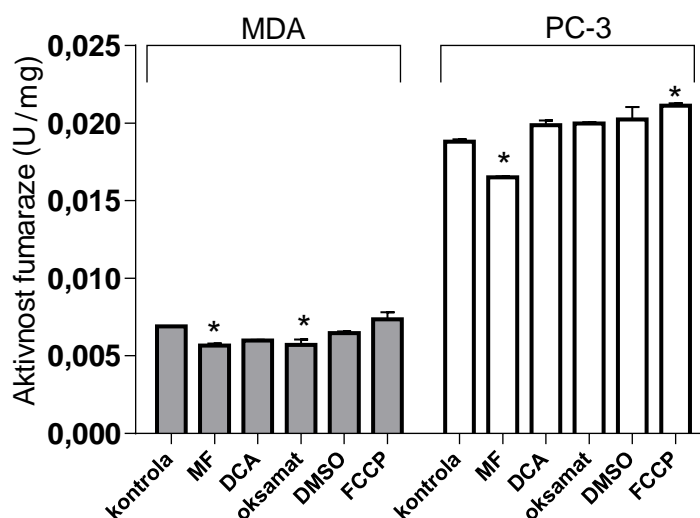
5  $\mu$ M oligomicin, inhibitor ATP sintaze (kompleksa V), je učinek NaCN na depolarizacijo mitohondrijske membrane celic MDA-MB-231 in PC-3 močno povečal (Slika 5). NaCN je zmanjšal mitohondrijski membranski potencial celic, vendar so ga lahko njihove funkcionalne ATP-sintaze ponovno vzpostavile s črpanjem protonov iz matriksa v medmembranski prostor (Martínez-Reyes in sod., 2016). Celice, ki so bile sočasno izpostavljene NaCN in oligomicinu, pa niso imele možnosti za vzpostavitev membranskega potenciala s pomočjo reverznega delovanja ATP-sintaze, zato je verjetno prišlo do veliko večje depolarizacije (Slika 5). Oligomicin je namreč inhibitor ATP-sintaze in naj bi povzročil hiperpolarizacijo mitohondrijev (Schcepina in sod., 2002; Sullivan in sod., 2015; Wyatt in Buckler, 2004), katere pa pri MDA-MB-231 in PC-3 celicah nismo opazili (Slika 5). Sposobnost rakavih celic za vzdrževanje mitohondrijskega membranskega potenciala z reverznim delovanjem ATP-sintaze so pokazali Wheaton in sod. (2014) z dodatkom 2,5  $\mu$ M oligomicina celicam, ki so bile tretirane z 1 mM metforminom. Podobno kot pri našem poskusu je tudi v tem primeru oligomicin močno zmanjšal fluorescenco TMRM v celicah z inhibirano dihalno verigo (Wheaton in sod., 2014).

Oksammat ni imel vpliva na mitohondrijski membranski potencial celic MDA-MB-231, v celicah PC-3 pa je 20 mM oksamat znižal mitohondrijski membranski potencial za približno 11 %. Oksammat je strukturni analog piruvata (Martin-Requero in sod., 1986), ki s kompetitivno vezavo na laktat dehidrogenazo prepreči vezavo piruvata na encim in njegovo pretvorbo v laktat (Zhao in sod., 2015). Na ta način spodbudi pretvorbo piruvata v acetyl-CoA in njegov vstop v Krebsov cikel, kar posredno spodbudi tudi oksidativno fosforilacijo (Yang in sod., 2014; Zhai in sod., 2013). Celice MDA-MB-231 imajo zaradi mutacij spremenjene komplekse dihalne verige. Aktivacija take dihalne verige bi povečala puščanje elektronov in tvorbo ROS, ki uničujejo mitohondrijsko membrano (Wang in sod., 2012). Vseeno pa statistično značilnega upada mitohondrijskega potenciala celic MDA-MB-231 po tretiranju z oksamatom nismo zaznali (Slika 5).

V PC-3 celicah je 20 mM oksamat povzročil manjši upad mitohondrijskega membranskega potenciala (Slika 5), kar bi lahko bila posledica sprememb v mitohondrijski membrani zaradi močno povečane tvorbe ROS (Zhai in sod., 2013). Ker pa je oksamat strukturni analog piruvata, bi lahko prek vezave na piruvat dehidrogenazo vplival tudi na Krebsov cikel. S tem, ko bi zasedel vezavna mesta za piruvat, bi zmanjšal neto pretok piruvata v Krebsov cikel, zaradi katerega bi lahko prišlo do upočasnitve Krebsovega cikla, zmanjšanja oskrbe dihalne verige z elektroni iz molekul NADH in FADH<sub>2</sub> za tvorbo ATP, kar pa bi nenazadnje lahko vodilo do upada mitohondrijskega membranskega potenciala. Na izoliranih podganjih jetrnih mitohondrijih je 2 mM oksamat po 5-15 minutah povzročil zelo majhen upad v tvorbi citrata, na aktivnost piruvat dehidrogenaze ni imel vpliva (Martin-Raquero in sod., 1986). Naše celice so bile precej dlje časa izpostavljene 10-krat višji koncentraciji oksamata, zato bi učinek na mitohondrijski membranski potencial, ki smo ga zaznali pri celicah PC-3, morda lahko bil posledica vpliva na Krebsov cikel.

Da bi dodatno opredelili aktivnost mitohondrijev v celicah MDA-MB-231 in PC-3, smo izmerili aktivnost fumaraze (Slika 6), ki v Krebsovem ciklu katalizira reakcijo pretvorbe fumarata v malat (Bardella in sod., 2012).





**Slika 6: Aktivnost fumaraze v celicah MDA-MB-231 in PC-3 po 24 urah tretiranja z različnimi modulatorji energijske presnove.** Ena enota fumaraze (U) je enaka količini encima, ki generira 1  $\mu$ mol NADH na minuto. Medij RPMI, v katerem smo gojili celice, je vseboval 1 g/L glukoze, 2 mM glutamin in 10 % FBS. Na celice smo učinkovali s 5 mM metforminom, 10 mM DCA, 10 mM oksamatom in 5  $\mu$ M FCCP. DMSO smo uporabili kot negativno kontrolo FCCP, ki je bil raztopljen v DMSO. Prikazane so povprečne vrednosti ( $\pm$ SEM) aktivnosti fumaraze.  $n=2$ ,  $N=1$ . \* $p<0,05$  v primeravi s kontrolo, Dunnettov *post hoc* test. MF: metformin, DCA: dikloroacetat, DMSO: dimetil sulfoksid.

Aktivnost fumaraze je bila tako v kontrolnih kot tudi v tretiranih celicah MDA-MB-231 precej manjša kot v celicah PC-3 (Slika 6). Nizka aktivnost fumaraze v celicah MDA-MB-231 kaže na to, da imajo manjšo kapaciteto za oksidativni metabolizem kot celice PC-3. Pri tretiranju z metforminom (5 mM) se je aktivnost fumaraze v celicah MDA-MB-231 znižala za 18,1 % in v celicah PC-3 za 12,2 % (Slika 6). Fumaraza velja za tumor supresorski protein, saj izguba njene aktivnosti vodi v kopičenje fumarata in sukcinata, stabilizacijo HIF-1 $\alpha$ , aktivacijo AMPK in varuje pred indukcijo programirane celične smrti, kar ne nazadnje pripomore k večji tumorigenosti celic (Bardella in sod., 2012). Nizko aktivnost fumaraze v celicah MDA-MB-231 bi morda lahko povezali z izjemno agresivnostjo in tumorigenostjo tega tipa raka.

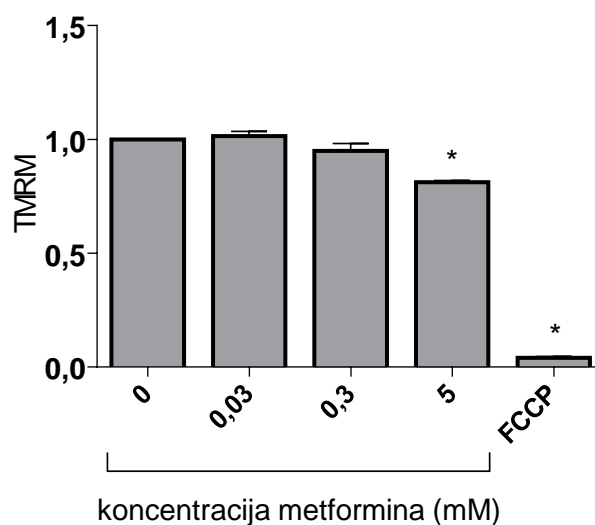
Metformin je v obeh celičnih linijah povzročil znižanje aktivnosti fumaraze (Slika 6), kar nakazuje, da se je upočasnil tok substratov skozi Krebsov cikel. Do zmanjšanja aktivnosti Krebsovega cikla pod vplivom metformina bi lahko prišlo posredno zaradi zaustavitve oksidativne fosforilacije in povečanja stopnje glikolize. Z oslabiljeno aktivnostjo Krebsovega cikla pri tretiranju z metforminom bi lahko bila na primer povezana zmanjšana oskrba mitohondrija s piruvatom (Andrzejewskega in sod. 2014). Naši rezultati so skladni z navedbami Andrzejewskega in sod. (2014), da metformin *in vitro* spodbudi aerobno

glikolizo v celicah raka dojke MCF-7 (za estrogenske receptorje pozitivnih celic raka dojke) in hkrati močno zmanjša aktivnost Krebsovega cikla. Pri MDA-MB-231 je zmanjšanje aktivnosti fumaraze povzročil še oksamat. Čeprav naj bi oksamat povečal aktivnost mitohondrijev z usmerjanjem piruvata v mitohondrij (Zhai in sod., 2013), bi lahko bil odziv celic MDA-MB-231 posledica aktivacije AMPK zaradi povečanja ROS in upada ATP. Aktivirana AMPK bi tako lahko inhibirala signalno pot PI3K/Akt/mTORC1, zaustavila proliferacijo celic in spodbudila prepis gena za p53, ki bi s tarčnim delovanjem na TIGAR usmeril tok glukoze v pentoza fosfatno pot za sintezo antioksidanta NADPH in posredno zmanjšal oskrbo mitohondrija s piruvatom. Tak obrambni mehanizem bi morda lahko zaznali posredno prek zmanjšanja aktivnosti fumaraze. Zmanjšana aktivnost fumaraze v celicah MDA-MB-231 po 24 urah bi lahko bila tudi posledica prilagoditve celic na zmanjšano oskrbo Krebsovega cikla s piruvatom zaradi inhibicije piruvat dehidrogenaze z oksamatom, katere pa z analizo mitohondrijskega membranskega potenciala po 40 minutah še nismo zaznali (Slika 5).

Čeprav smo pri celicah PC-3 zaznali upad mitohondrijskega membranskega potenciala pod vplivom 20 mM oksamata (Slika 5), njegovega vpliva na aktivnost fumaraze nismo zaznali (Slika 6). Pospešitev Krebsovega cikla in s tem povezano povečanje aktivnosti fumaraze v PC-3 celicah, na katere smo delovali s 5  $\mu$ M FCCP (Slika 6), bi lahko bila posledica prilagoditve celic na pospešitev delovanja dihalne verige. FCCP namreč drastično depolarizira notranjo mitohondrijsko membrano in poveča porabo kisika, kar kaže na pospešeno delovanje dihalne verige, vendar pri tem poraba kisika ni sklopljena z nastankom ATP (Sullivan in sod., 2015).

#### 4.2 MITOHONDRIJSKI MEMBRANSKI POTENCIAL CELIC MDA-MB-231 PRI TRETIRANJU Z RAZLIČNIMI KONCENTRACIJAMI METFORMINA

Da bi preverili, ali metformin zavira delovanje dihalne verige celic MDA-MB-231, smo proliferirajoče celice MDA-MB-231 za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam metformina (0,03-5 mM). Vpliv metformina na delovanje dihalne verige smo ocenili z uporabo barvila TMRM, ki se v mitohondriju kopiči v odvisnosti od mitohondrijskega membranskega potenciala (Perry in sod., 2011).

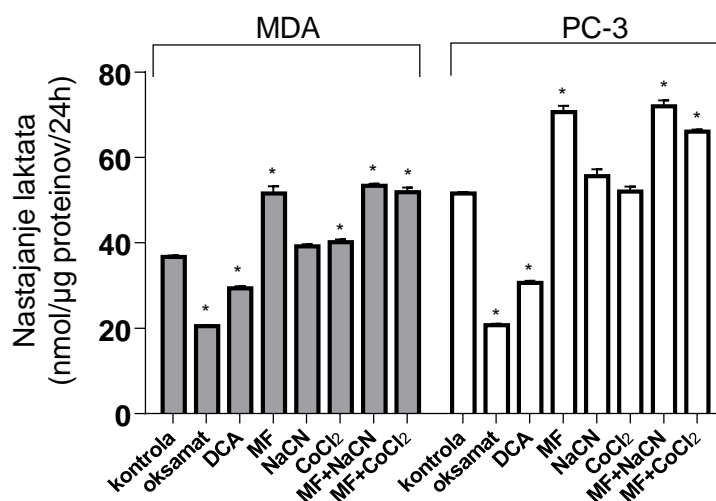


**Slika 7: Vpliv metformina na mitohondrijski membranski potencial celic MDA-MB-231 po 24 urah tretiranja z različnimi koncentracijami metformina.** Medij RPMI, v katerem smo gojili celice, je vseboval 1 g/L glukoze, 2 mM glutamin in 10% FBS. Odklopnik FCCP (40  $\mu$ M) smo uporabili kot pozitivno kontrolo. Prikazane so povprečne vrednosti ( $\pm$ SEM) fluorescence TMRM. N=3-4. \* $p < 0,05$  v primeravi s kontrolo (0 mM metformin), Dunnettov *post hoc* test.

Po 24-urnem tretiranju z metforminom se je trend upada mitohondrijskega membranskega potenciala pojavil pri 0,3 mM metforminu. Do pomembnega znižanja mitohondrijskega membranskega potenciala glede na kontrolo je prišlo pri celicah, ki so bile izpostavljene 5 mM metforminu (Slika 7). Rezultati potrjujejo našo prvo hipotezo, da metformin zmanjša mitohondrijski membranski potencial celic MDA-MB-231. V odvisnosti od mitohondrijskega membranskega potenciala metformin zaradi svojega pozitivnega naboja počasi prehaja v matriks mitohondrija, kjer naj bi po nekaterih ocenah dosegel do 1000-krat večje koncentracije kot v zunajceličnem okolju (Bridges in sod., 2014). V mitohondriju reverzibilno inhibira kompleks I dihalne verige (Bridges in sod., 2014). Zaradi tega upade črpanje protonov prek notranje mitohondrijske membrane, protoni se nakopičijo v mitohondriju, kar povzroči depolarizacijo mitohondrijske membrane. Vzrok za to, da po 24 urah tretiranja z metforminom ne zaznamo veliko večjega upada mitohondrijskega membranskega potenciala v celicah MDA-MB-231, bi lahko bilo reverzno delovanje ATP-sintaze. V tem primeru ATP-sintaza deluje kot ATP-aza; protone črpa v medmembranski prostor, pri tem pa porablja ATP. Wheaton in sod. (2014) depolarizacije membrane celic raka debelega črevesa zaradi 1 mM metformina niso zaznali, kar razlagajo ravno s sposobnostjo reverznega delovanja ATP-sintaze.

### 4.3 VPLIV METFORMINA NA NASTAJANJE LAKTATA V CELICAH MDA-MB-231 IN PC-3

Ali metformin poveča stopnjo glikolize in s tem spodbudi nastajanje laktata v celicah MDA-MB-231 smo preverili z merjenjem koncentracije laktata v hranilnem mediju. Preverili smo tudi, kako na nastanek laktata vplivajo drugi modulatorji energijske presnove. Celice MDA-MB-231 in PC-3 smo 24 ur tretirali z metforminom (5 mM) in drugimi modulatorji energijske presnove. Vpliv modulacije različnih presnovnih poti na nastajanje laktata smo sistematično preverili z oksamatom, dikloroacetatom, NaCN in  $\text{CoCl}_2$  (aktivatorjem HIF-1 $\alpha$  in induktorjem izražanja glikolitičnih encimov).



**Slika 8:** Nastajanje laktata v mediju celic MDA-MB-231 in PC-3 po 24-urni izpostavljenosti metforminu in drugim modulatorjem energijske presnove. Celice smo 24 ur gojili v mediju RPMI z 1 g/L glukoze, 2 mM glutaminom in brez FBS. Celice smo tretirali z 10 mM oksamatom, 10 mM DCA, 5 mM metforminom, 5 mM NaCN in 250  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ . Prikazane so povprečne vrednosti ( $\pm$ SEM) nastalega laktata na maso proteinov v vzorcih.  $n=3$ ,  $N=1$ . \* $p < 0,05$  v primeravi s kontrolo, Dunnettov *post hoc* test. DCA: dikloroacetat, MF: metformin.

Povečanje količine laktata smo pri obeh linijah določili v mediju celic, tretiranih z metforminom in kombinacijama metformin z NaCN in metformin s  $\text{CoCl}_2$  (Slika 8). 5 mM metformin je v rakavih celicah MDA-MB-231 in PC-3 spodbudil tvorbo laktata (Slika 8), kar bi lahko bila posledica aktivacije AMPK, ki spodbuja glikolizo za povečanje ATP v celici (Hao in sod., 2010). Navedeni rezultati potrjujejo našo hipotezo, da bo metformin povečal nastajanje laktata v celicah. Za nekatere bigvanide, kot je na primer fenformin, je namreč znano, da so pri bolnikih povzročali laktacidozo, ki je z uporabo metformina postala redkejši stranski pojav (Foretz in sod., 2014). Naši rezultati so podobni študiji, ki je pokazala, da metformin deluje neposredno na mitohondrije, zmanjša njihovo respiracijo in

sposobnost tvorbe ATP (Andrzejewski in sod., 2014). Omejitev tvorbe ATP v mitohondrijih so celice raka dojke v tem primeru razrešile s povečanjem aerobne glikolize, kar se je pokazalo s povečanjem koncentracije laktata v mediju (Andrzejewski in sod., 2014).

Pri tretiranju z metforminom v kombinaciji z NaCN ali  $\text{CoCl}_2$  je pospešeno nastajanje laktata najverjetneje posledica delovanja metformina (Slika 8). Samo inhibicija kompleksa IV z NaCN ni povzročila povečanja laktata. Če privzamemo, da smo NaCN uporabili v dovolj visoki koncentraciji, da je povzročil inhibicijo kompleksa IV, lahko na podlagi tega rezultata sklepamo, da oksidativna razgradnja glukoze za celice MDA-MB-231 in PC-3 ni zelo pomemben vir ATP. Izpostavitve  $\text{CoCl}_2$  je malenkostno povečala količino laktata samo pri MDA-MB-231 celicah (Slika 8).  $\text{CoCl}_2$  povzroči stabilizacijo HIF-1 $\alpha$  (Yuan in sod., 2003), ki posredno spodbuja glikolizo. Rezultati za celice MDA-MB-231 so podobni navedbam Mobasher in sod. (2006), ki so s tretiranjem hondrocit s 75  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  spodbudili glikolizo in tvorbo laktata. Pričakovali bi, da bi s tem sovpadali tudi rezultati za celice PC-3. Tako metformin kot  $\text{CoCl}_2$  spodbujata glikolizo, zato bi pričakovali močno spodbujeno tvorbo laktata v celicah, ki smo jih tretirali s kombinacijo metformina in  $\text{CoCl}_2$ . Razlog, zakaj do tega ni prišlo, bi lahko pripisali koncentraciji  $\text{CoCl}_2$  (250  $\mu\text{M}$ ), ki smo jo uporabili pri poskusu. Za to koncentracijo Mobasher in sod. (2006) poudarjajo, da naj bi na *in vitro* gojenih celicah že imela toksične učinke. Po drugi strani pa je treba poudariti, da  $\text{CoCl}_2$  prek indukcije HIF-1 $\alpha$  spodbudi izražanje glikolitičnih encimov, kar pa še ne pomeni njihove povečane aktivnosti (Pirkmajer in sod., 2010). Hitrost glikolize je namreč pod natančnim nadzorom alosteričnih regulatorjev in različnih kinaz, ki uravnavajo aktivnost encimov kot so heksokinaza, fosfofruktokinaza-1 in piruvat kinaza (Šmerc in sod., 2011). Sklepamo pa lahko, da imajo celice, tretirane s  $\text{CoCl}_2$ , večjo kapaciteto za glikolizo, ki bi se razkrila, če bi jih izpostavili hipoksiji. Oksamat, inhibitor laktat dehidrogenaze in dikloroacetat, posredni aktivator piruvat dehidrogenaze sta zavrla nastajanje laktata v celicah MDA-MB-231 in PC-3 (Slika 8). Zhao in sod. (2015) so potrdili, da oksamat zaustavi aerobno glikolizo z inhibicijo laktat dehidrogenaze in močno zmanjša nastajanje laktata. Dikloroacetat je nastajanje laktata najverjetneje upočasnil posredno, s spodbujanjem vnosa piruvata v mitohondrij in njegovo pretvorbo v acetyl-CoA.

#### 4.4 VPLIV INHIBICIJE KOMPLEKSA IV NA Z METFORMINOM SPODBUJENO AKTIVACIJO AMPK V CELICAH MDA-MB-231 IN PC-3

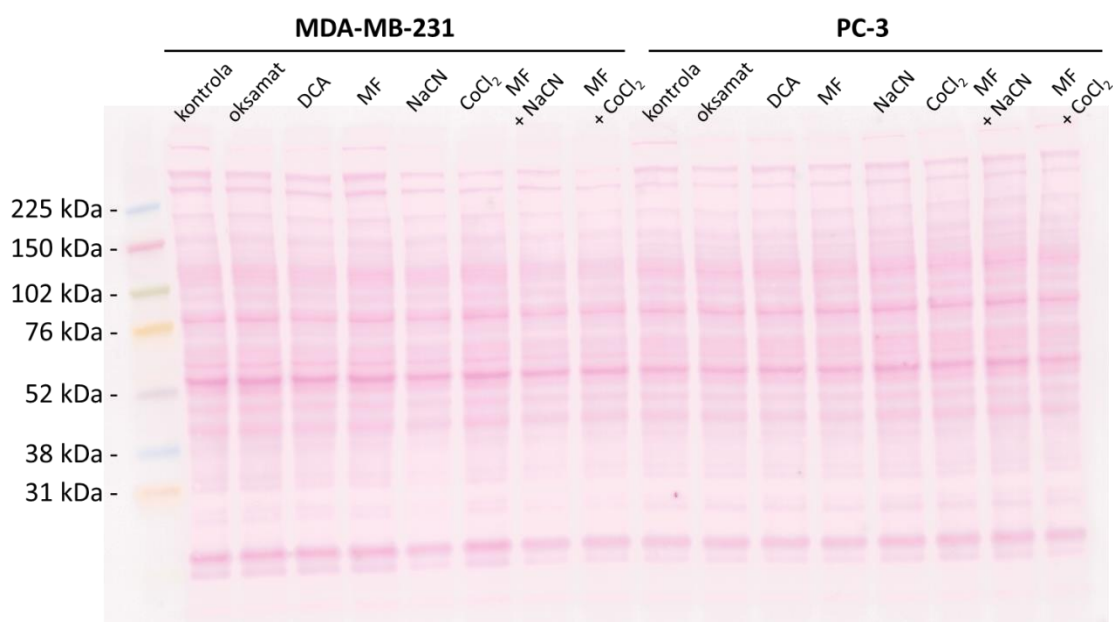
Ali inhibicija kompleksa IV vpliva na z metforminom spodbujeno fosforilacijo AMPK v celicah MDA-MB-231 in PC-3 smo preverili z določanjem fosforilacije AMPK s prenosom western. Celice MDA-MB-231 in PC-3 smo izpostavili tudi drugim modulatorjem energijske presnove in preverili, ali v celicah povzročijo energijski stres.

Dobljene rezultate za MDA-MB-231 smo primerjali z rezultati PC-3 celic, da bi ugotovili, ali se njuni odzivi na tretmaje razlikujejo.

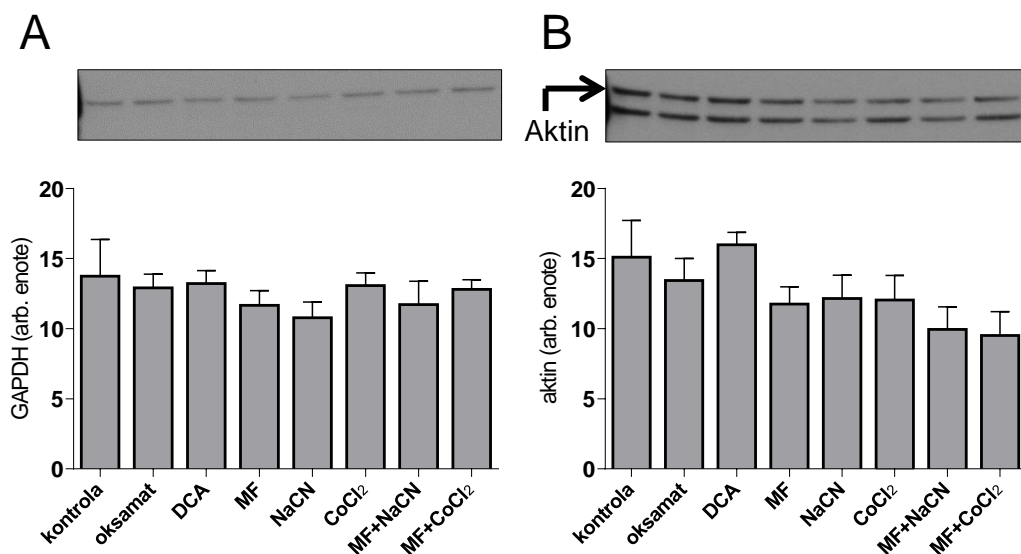
#### 4.4.1 Endogeni kontroli GAPDH in aktin

Raven fosforilirane AMPK (pAMPK), fosforilrane ACC (pACC) in HIF-1 $\alpha$  se pogosto normira na kakšno od klasičnih endogenih kontrol, kot sta gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH) in aktin. Najpomembnejša lastnost izbrane endogene kontrole je, da poskusne razmere ne vplivajo na njeno izražanje. Aktin je v celicah prisoten v zelo visokih koncentracijah, saj je pomembna sestavna komponenta citoskeleta. Na njegovo sintezo vplivajo spremembe v razmerah rasti celic (Johnson, 2015). GAPDH je glikolitični protein s pomembno vlogo pri nastajanju energije (Sirover, 2012), vpleten pa je tudi v transkripcijo genov, transport RNA, replikacijo DNA in programirano celično smrt (Johnson, 2015). Njegovo izražanje se poveča v hipoksičnih razmerah (Johnson, 2015). Povečana stopnja glikolize in oksidativni stres v rakavih celicah bi lahko vplivala na povečanje izražanja GAPDH (Sirover, 2012).

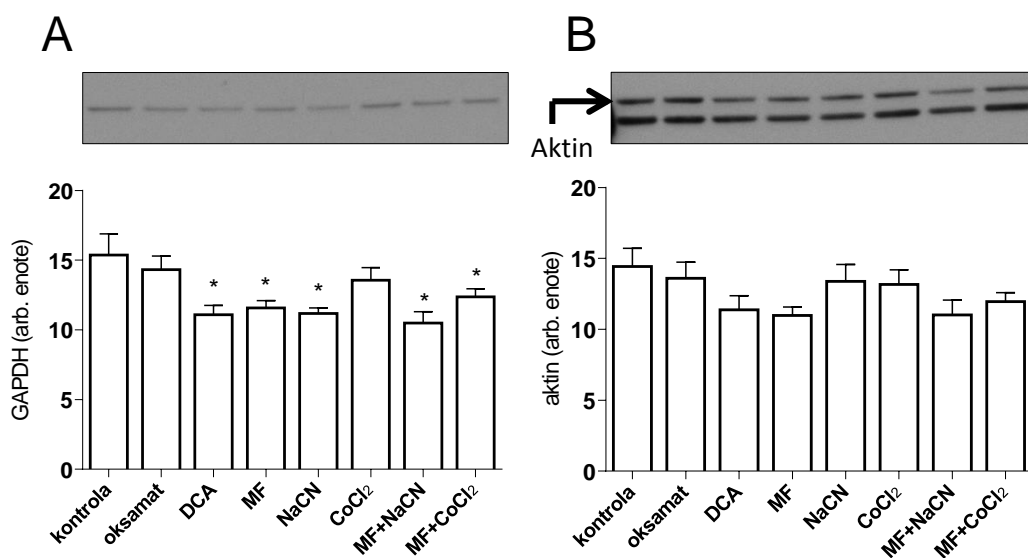
Da bi preverili, ali sta kontroli ustrezni za naše poskusne razmere, smo izmerili njuno izražanje pod vplivom različnih modulatorjev energijske presnove (Slika 10, 11).



**Slika 9:** S Ponceau S pobarvana membrana ločenih proteinov v vzorcih MDA-MB-231 in PC-3 celic po 24-urni izpostavitvi različnim modulatorjem energijske presnove. S pomočjo velikostnih markerjev smo membrano razrezali na trakove, na katerih smo detektirali posamezne proteine v vzorcih. DCA: dikloroacetat, MF: metformin.



**Slika 10: Endogeni kontroli GAPDH in aktin v celicah MDA-MB-231.** Celice so bile 24 ur tretirane z različnimi modulatorji energijske presnove (5 mM metformin, 10 mM oksamat, 10 mM DCA, 5 mM NaCN, 250  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>) v mediju RPMI z 1 g/L glukoze, 2 mM glutaminom, brez FBS. Prikazane so povprečne vrednosti ( $\pm$ SEM) rezultatov denzitometrične analize (A) GAPDH in (B) aktina v arbitrarnih enotah. n=6, N=2. \*p<0,05 v primeravi s kontrolo, Dunnettov *post hoc* test. Detekcija aktina je potekala na membrani, s katere predhodno nismo odstranili protiteles za GAPDH, da s postopkom odstranjevanja ( $\gg$ stripping $\ll$ ) ne bi poškodovali membrane (B). DCA: dikloroacetat, MF: metformin.



**Slika 11: Endogeni kontroli GAPDH in aktin v celicah PC-3.** Celice so bile 24 ur tretirane z različnimi modulatorji energijske presnove (5 mM metformin, 10 mM oksamat, 10 mM DCA, 5 mM NaCN, 250  $\mu$ M  $\text{CoCl}_2$ ) v mediju RPMI z 1 g/L glukoze, 2 mM glutaminom, brez FBS. Prikazane so povprečne vrednosti ( $\pm$ SEM) rezultatov denzitometrične analize (A) GAPDH in (B) aktina v arbitrarnih enotah.  $n=6$ ,  $N=2$ . \* $p<0,05$  v primerjavi s kontrolo, Dunnettov *post hoc* test. Detekcija aktina je potekala na membrani, s katere predhodno nismo odstranili protiteles za GAPDH, da s postopkom odstranjevanja ( $\gg$ stripping $\ll$ ) ne bi poškodovali membrane (B). DCA: dikloroacetat, MF: metformin.

Po 24-urni izpostavitvi različnim modulatorjem energijske presnove nismo zaznali bistvenih sprememb v izražanju aktina in GAPDH glede na kontrolno skupino celic MDA-MB-231 (Slika 10). Kljub temu pa njuno izražanje ni bilo povsem stabilno. V primerjavi s celicami MDA-MB-231 so imeli modulatorji energijske presnove na izražanje GAPDH v celicah PC-3 precej večji učinek. Bistveno zmanjšanje izražanja GAPDH glede na kontrolo so po 24 urah povzročili dikloroacetat, metformin, NaCN ter kombinaciji metformina z NaCN in  $\text{CoCl}_2$  (Slika 11A). V celicah PC-3, tretiranih z dikloroacetatom, metforminom in kombinacijama metformina z NaCN in  $\text{CoCl}_2$ , smo sicer zaznali zmanjšano izražanje aktina, vendar pa to ni bilo statistično značilno različno glede na kontrolo (Slika 11B).

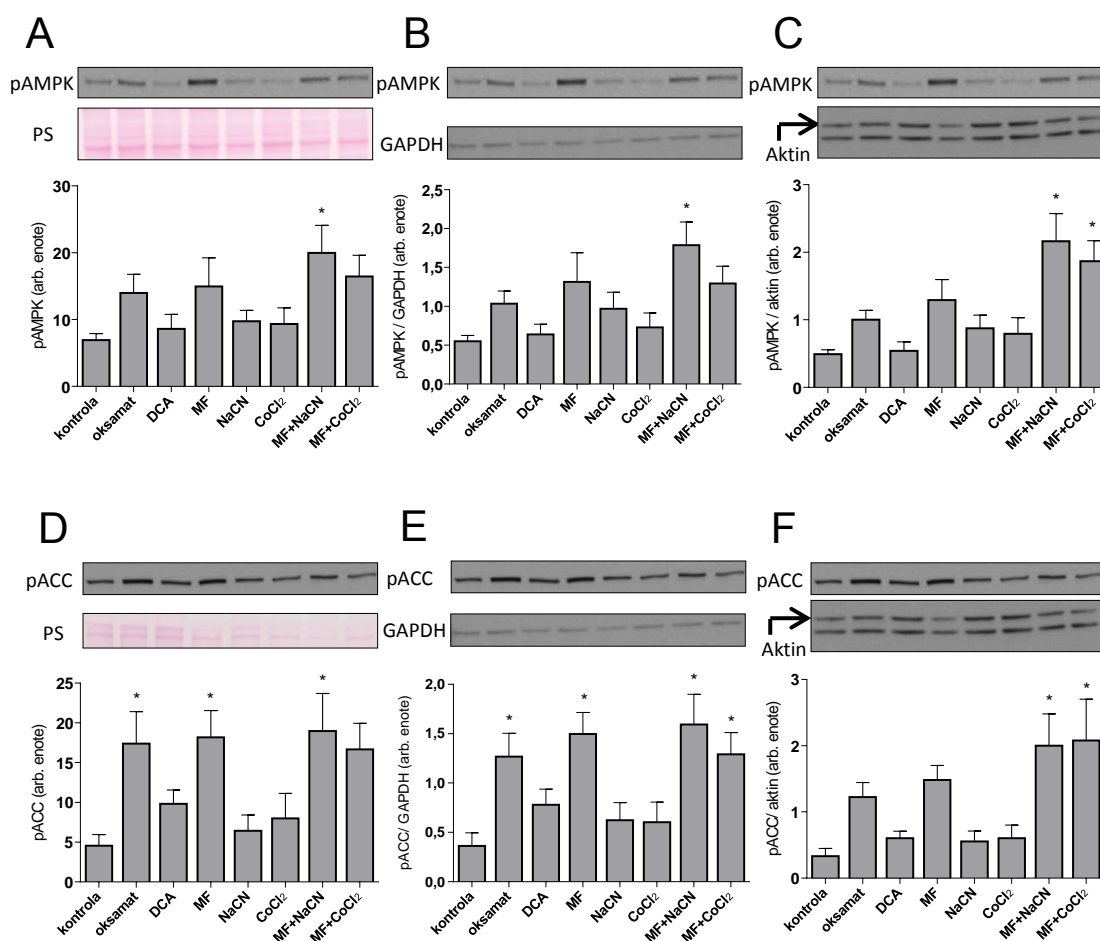
Z modulatorji energijske presnove smo vplivali na proces rasti in proliferacije celic. Čeprav pri MDA-MB-231 ni nobeden od modulatorjev povzročil statistično značilno različne spremembe v izražanju aktina, lahko upad v izražanju opazimo pri celicah izpostavljenih metforminu, NaCN,  $\text{CoCl}_2$  ter pri kombinacijama metformina z NaCN in  $\text{CoCl}_2$  (Slika 10B). V celicah PC-3 bistvenega vpliva modulatorjev na izražanje aktina nismo zaznali (Slika 11B).

Uporabljeni modulatorji niso vplivali na izražanje GAPDH v celicah MDA-MB-231 (Slika 10A), v celicah PC-3 pa je bil njihov vpliv precejšen (Slika 11A). Pričakovali bi, da bo na GAPDH vplival predvsem  $\text{CoCl}_2$ , ki kot induktor HIF-1 $\alpha$  v celici posnema stanje hipoksije (t.i. kemična hipoksija) (Yuan in sod., 2003), vendar tega nismo zaznali niti pri celicah PC-3. V MDA-MB-231 ni nobeden od tretmajev bistveno vplival na endogeni kontroli, je pa pri GAPDH manj odstopanj kot pri aktinu, zato bi lahko bil v teh celicah GAPDH primernejša endogena kontrola. Zaradi nestabilnosti izražanja GAPDH se je v celicah PC-3 za primernejšo endogeno kontrolo izkazal aktin. Čeprav smo z barvanjem membrane s Ponceau S (Slika 9) pokazali, da sta bila nanos vzorcev in razporeditev proteinov enakomerna, smo po denzitometrični analizi opazili precej variabilnosti v izraženosti endogenih kontrol znotraj iste celične linije. Menimo, da lahko ta odstopanja z normiranjem vplivajo na rezultate in posledično tudi na interpretacijo. Da bi se temu izognili in hkrati to tudi nazorno predstavili, so v nadaljevanju rezultati prenosa western predstavljeni na tri načine in sicer: 1) v nenormirani, 2) na GAPDH normirani in 3) na aktin normirani obliki.



#### 4.4.2 Fosforilacija AMPK in ACC

Z merjenjem fosforilacije AMPK in ACC v vzorcih celic MDA-MB-231 in PC-3 smo želeli ugotoviti, ali metformin in drugi modulatorji energijske presnove povzročijo energijski stres in ali sočasna inhibicija kompleksa IV poveča z metforminom spodbujeno fosforilacijo AMPK. Da bi potrdili aktivacijo AMPK z različnimi modulatorji energijskega metabolizma, smo v vzorcih detektirali še fosforilirano obliko ACC, ki je ena glavnih tarč aktivirane AMPK. Odziv celic MDA-MB-231 smo primerjali z odzivom PC-3.



**Slika 12: Fosforilacija AMPK na Thr<sup>172</sup> in njene tarče ACC na Ser<sup>79</sup> v celicah MDA-MB-231.** Celice so bile 24 ur tretirane z različnimi modulatorji energijske presnove (5 mM metformin, 10 mM oksamat, 10 mM DCA, 5 mM NaCN, 250  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>) v mediju RPMI z 1 g/L glukoze, 2 mM glutaminom, brez FBS. Prikazane so povprečne vrednosti ( $\pm$ SEM) (A in D) nenormiranih, (B in E) na GAPDH normiranih in (C in F) na aktin normiranih rezultatov denzitometrične analize pAMPK in pACC v arbitrarnih enotah. n=6, N=2. \*p<0,05 v primeravi s kontrolo, Dunnettov *post hoc* test. Detekcija aktina je potekala na membrani, s katere predhodno nismo odstranili protiteles za GAPDH, da s postopkom odstranjevanja (»stripping«) ne bi poškodovali membrane (C in F). DCA: dikloroacetat, MF: metformin, PS: Ponceau S.

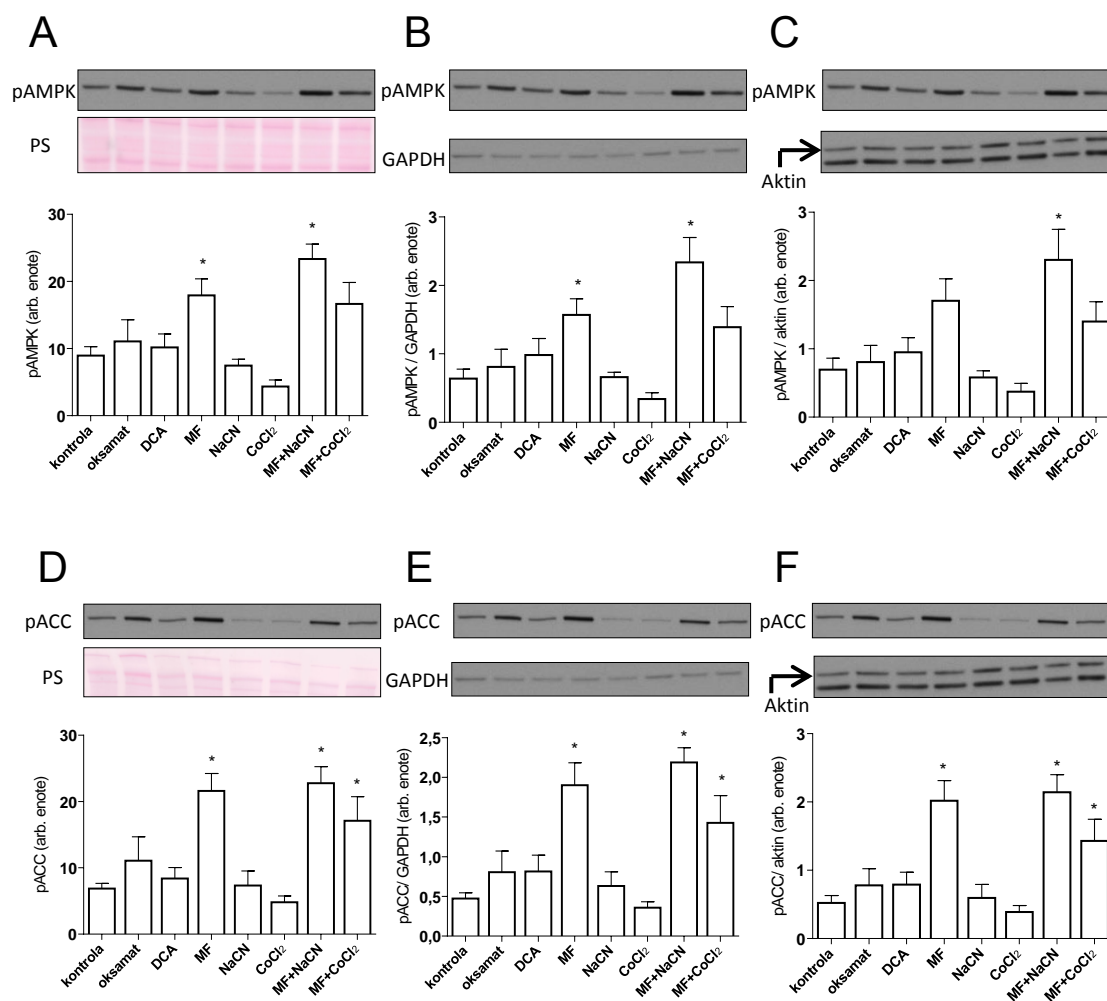
Po 24 urah so oksamat, metformin in metformin s  $\text{CoCl}_2$  nekoliko povečali fosforilacijo AMPK v celicah MDA-MB-231 (Slika 12A, B). NaCN je fosforilacijo AMPK močno povečal samo v kombinaciji z metforminom (Slika 12A, B, C). Čeprav pri tretiranju z metforminom in oksamatom nismo zaznali statistično značilnega povečanja fosforilacije AMPK v celicah MDA-MB-231, so to nedvoumno potrdili rezultati za fosforilirano obliko ACC (Slika 12). Naši rezultati niso povsem skladni z nedavno študijo, ki je pokazala, da je že 0,5 mM metformin v mediju z 1 g/L glukoze močno aktiviral AMPK v MDA-MB-231 celicah (Zordoky in sod., 2014). Morda je vzrok za razliko v tem, da smo mi uporabili celice MDA-MB-231, ki izražajo kinazo LKB1 (Rajh in sod., 2016), medtem ko so bile celice MDA-MB-231 v tej študiji brez LKB1. Spremembe v fosforilaciji ACC so bile veliko večje kot v fosforilaciji AMPK (Slika 12). To lahko razložimo z vsaj dvema mehanizmoma. Prvič: AMPK se lahko aktivira alosterično in/ali kovalentno s fosforilacijo. Alosterična aktivacija poveča njeno aktivnost za približno 10-krat, fosforilacija na Thr<sup>172</sup> pa še za 200-krat. Ob maksimalni stimulaciji se tako aktivnost AMPK lahko poveča tudi 2000-krat (Hardie, 2011). Omejitev posrednega določanja aktivacije AMPK z merjenjem fosforilacije Thr<sup>172</sup> z metodo western je v tem, da alosterične aktivacije ne moremo zaznati. Kljub majhni spremembi fosforilacije AMPK torej ne moremo izključiti možnosti, da je bila njena aktivnost močno povečana zaradi delovanja alosteričnega aktivatorja AMP. Drugič: upoštevati moramo ojačanje signala vzdolž signalne poti (Alberts in sod., 2009). Ko je AMPK enkrat aktivna, lahko fosforilira več molekul ACC. Majhno povečanje aktivnosti AMPK lahko torej pripelje do precej večjega povečanja fosforilacije ACC, kot bi lahko pričakovali zgolj z merjenjem fosforilacije AMPK.

Predpostavljali smo, da bo sočasna inhibicija kompleksa IV z NaCN povzročila hitrejši in večji upad mitohondrijskega membranskega potenciala in povečala z metforminom spodbujeno fosforilacijo AMPK. Tako kot metformin tudi NaCN sam ni imel statistično pomembnega učinka, skupaj pa sta povečala fosforilacijo AMPK in ACC glede na kontrolo (Slika 12), vendar se razlika med vplivom metformina in metformina z NaCN ni izkazala za statistično značilno ( $p > 0,05$ ). Tak rezultat naše hipoteze o povečanju z metforminom spodbujene fosforilacije AMPK pod vplivom NaCN za celice MDA-MB-231 neposredno ne podpira, je pa na Sliki 12A, B, C možnost sinergističnega delovanja NaCN in metformina nakazana.

Metformin s  $\text{CoCl}_2$  je konsistentno povečal fosforilacijo AMPK glede na kontrolo, vendar razlika ni bila statistično značilna ( $p > 0,05$ ) (Slika 12A, B). Z normiranjem na aktin pa je ta razlika postala statistično značilna (Slika 12C).  $\text{CoCl}_2$  ni zmanjšal z metforminom spodbujene fosforilacije AMPK. Sam metformin je močno spodbudil fosforilacijo ACC, v kombinaciji s  $\text{CoCl}_2$  pa nekoliko manj (Slika 12D), kar bi lahko bilo povezano z manjšim energijskim stresom. S  $\text{CoCl}_2$  stabiliziran HIF-1 $\alpha$  namreč spodbuja izražanje glikolitičnih encimov (Dakubo, 2010), s čemer poveča kapaciteto celic za glikolizo. Zaradi s  $\text{CoCl}_2$  pospešene glikolize bi lahko inhibicija dihalne verige z metforminom povzročila manjši

energijski stres v primerjavi z metforminom samim.  $\text{CoCl}_2$  na fosforilacijo ACC v celicah MDA-MB-231 ni vplival.

Celice MDA-MB-231 smo izpostavili oksamatu, da bi ugotovili, ali inhibicija glikolize povzroči energijski stres. Oksamat je povzročil precejšen porast fosforilacije AMPK in ACC (Slika 12), kar kaže na to, da je za celice MDA-MB-231 glikoliza zelo pomembna, saj je zaustavitev glikolize povzročila močan energijski stres.



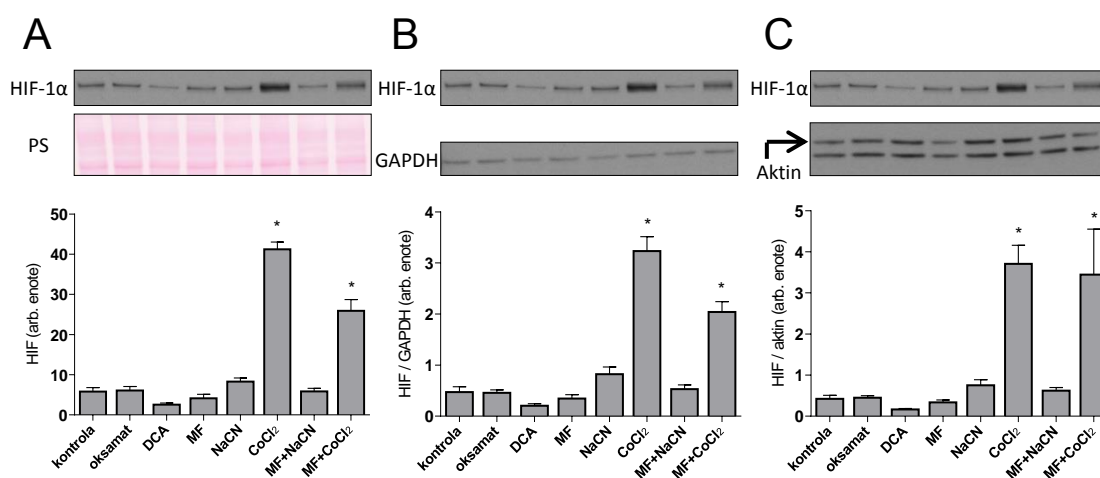
**Slika 13: Fosforilacija AMPK na Thr<sup>172</sup> in njene tarče ACC na Ser<sup>79</sup> v celicah PC-3.** Celice so bile 24 ur tretirane z različnimi modulatorji energijske presnove (5 mM metformin, 10 mM oksamat, 10 mM DCA, 5 mM NaCN, 250  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ ) v mediju RPMI z 1 g/L glukoze, 2 mM glutaminom, brez FBS. Prikazane so povprečne vrednosti ( $\pm$ SEM) (A in D) nenormiranih, (B in E) na GAPDH normiranih in (C in F) na aktin normiranih rezultatov denzitometrične analize pAMPK in pACC v arbitrarnih enotah.  $n=6$ ,  $N=2$ . \* $p<0,05$  v primerjavi s kontrolno, Dunnettov *post hoc* test. Detekcija aktina je potekala na membrani, s katere predhodno

nismo odstranili protiteles za GAPDH, da s postopkom odstranjevanja (»stripping«) ne bi poškodovali membrane (C in F). DCA: dikloroacetat, MF: metformin, PS: Ponceau S.

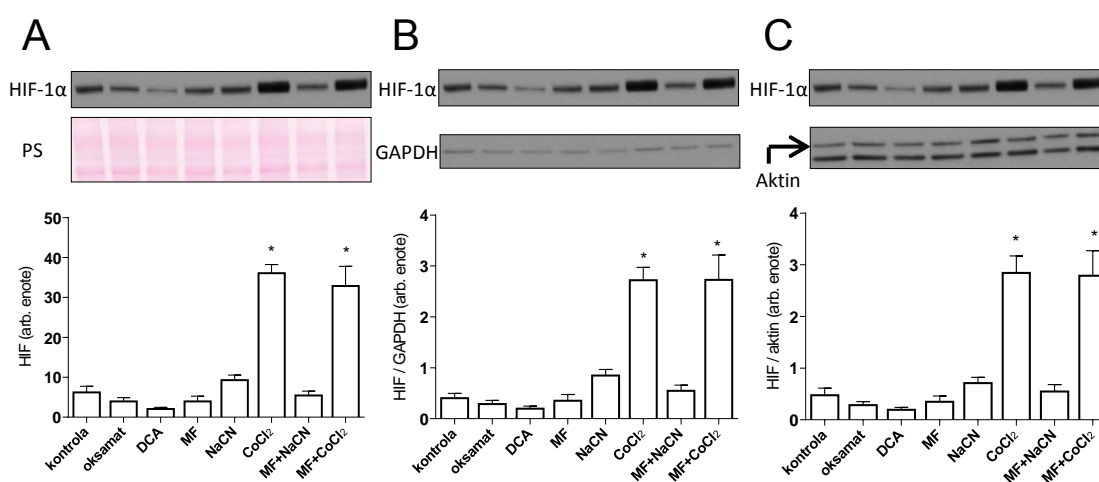
Po 24 urah so fosforilacijo AMPK in ACC v celicah PC-3 spodbudili metformin in kombinaciji metformina z NaCN in  $\text{CoCl}_2$  (Slika 13). V celicah PC-3 NaCN ni prispeval k povečanju z metforminom spodbujeni fosforilaciji AMPK ( $p > 0,05$ ), kar naše hipoteze za celice PC-3 ne podpira. V primerjavi s celicami MDA-MB-231, pri katerih je bila razlika v vplivu metformina in metformina z NaCN vsaj nakazana (Slika 12A, B, C), pri PC-3 praktično ni bilo razlike v fosforilaciji AMPK in ACC. Za razliko od celic MDA-MB-231 (Slika 12), oksamat v celicah PC-3 ni povečal fosforilacije AMPK in ACC (Slika 13), kar kaže na potencialne razlike v metabolnem profilu celic. Ker je zaustavitev glikolize z oksamatom celice MDA-MB-231 spravila v energijski stres, celice PC-3 pa ne, lahko sklepamo, da so celice MDA-MB-231 bolj odvisne od glikolize kot PC-3. Omejen učinek oksamata na celice PC-3 kaže na to, da imajo te celice večjo kapaciteto za oksidativni metabolizem kot celice MDA-MB-231. To je skladno tudi z meritvami fumaraze, pri katerih je oksamat zmanjšal aktivnost fumaraze samo v celicah MDA-MB-231, v PC-3 pa ne (Slika 6). Podobno kot pri MDA-MB-231, je tudi pri celicah PC-3 nakazan inhibični vpliv  $\text{CoCl}_2$  na z metforminom spodbujeno aktivacijo AMPK, vendar razlika ni dosegla statistične značilnosti ( $p > 0,05$ ).

#### 4.5 VPLIV METFORMINA NA INDUKCIJO TRANSKRIPCIJSKEGA DEJAVNIKA HIF-1 $\alpha$ V CELICAH MDA-MB-231 IN PC-3

Ali indukcija HIF-1 $\alpha$  zmanjša delovanje metformina, smo ugotavljali z določanjem transkripcijskega dejavnika HIF-1 $\alpha$  v vzorcih MDA-MB-231 in PC-3 celic. Odziv MDA-MB-231 celic smo primerjali z odzivom PC-3.



**Slika 14: Izražanje HIF-1 $\alpha$  v celicah MDA-MB-231.** Celice so bile 24 ur tretirane z različnimi modulatorji energijske presnove (5 mM metformin, 10 mM oksamat, 10 mM DCA, 5 mM NaCN, 250  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>) v mediju RPMI z 1 g/L glukoze, 2 mM glutaminom, brez FBS. Prikazane so povprečne vrednosti ( $\pm$ SEM) (A) ne-normiranih, (B) na GAPDH normiranih in (C) na aktin normiranih rezultatov denzitometrične analize HIF-1 $\alpha$  v arbitrarnih enotah. n=6, N=2. \*p<0,05 v primeravi s kontrolo, Dunnettov *post hoc* test. Detekcija aktina je potekala na membrani, s katere predhodno nismo odstranili protiteles za GAPDH, da s postopkom odstranjevanja (»stripping«) ne bi poškodovali membrane (C). DCA: dikloroacetat, MF: metformin, PS: Ponceau S.



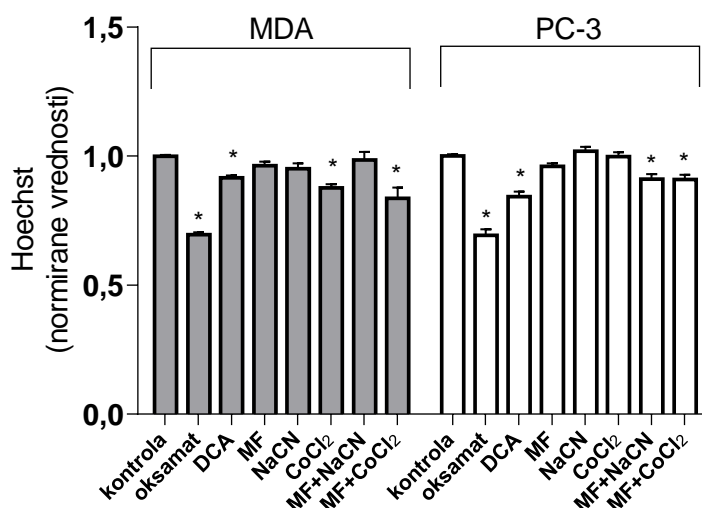
**Slika 15: Izražanje HIF-1 $\alpha$  v celicah PC-3.** Celice so bile 24 ur tretirane z različnimi modulatorji energijske presnove (5 mM metformin, 10 mM oksamat, 10 mM DCA, 5 mM NaCN, 250  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>) v mediju RPMI z 1 g/L glukoze, 2 mM glutaminom, brez FBS. Prikazane so povprečne vrednosti ( $\pm$ SEM) (A) ne-normiranih, (B) na GAPDH normiranih in (C) na aktin normiranih rezultatov denzitometrične analize HIF-1 $\alpha$  v arbitrarnih enotah. n=6, N=2. \*p<0,05 v primeravi s kontrolo, Dunnettov *post hoc* test. Detekcija aktina je potekala na membrani, s katere predhodno nismo odstranili protiteles za GAPDH, da s postopkom odstranjevanja (»stripping«) ne bi poškodovali membrane (C). DCA: dikloroacetat, MF: metformin, PS: Ponceau S.

CoCl<sub>2</sub> je v celicah MDA-MB-231 in PC-3 močno povečal raven transkripcijskega dejavnika HIF-1 $\alpha$  (Slika 14, Slika 15). Dikloroacetat pa je pri obeh celičnih linijah povzročil upad ravni HIF-1 $\alpha$ , vendar ta ni bil statistično značilno različen glede na kontrolo (Slika 14, Slika 15). V celicah MDA-MB-231 je metformin zavrl s CoCl<sub>2</sub> inducirano aktivacijo HIF-1 $\alpha$  (Slika 14) (p<0,05), medtem ko tega učinka v celicah PC-3 ni imel (p>0,05), kar potrjuje našo hipotezo samo za celice MDA-MB-231. Rezultati za MDA-MB-231 so skladni z izsledki študije Tadakawa in sod. (2015), ki so na celični liniji podganjega leiomioma preučevali vpliv metformina na s 150  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> inducirani HIF-1 $\alpha$ .

2,5 mM metformin je pomembno znižal raven HIF-1 $\alpha$  v celicah, na HIF-1 $\alpha$  mRNA pa ni vplival, zato so preverili še vpliv metformina na mTORC1. Rezultati so potrdili, da je metformin zaustavil sintezo HIF-1 $\alpha$  prek fosforilacije AMPK, ki je s fosforilacijo proteina Raptor inhibirala aktivnost mTORC1 (Tadakawa in sod., 2015). Tudi Zorodky in sod. (2014) so potrdili, da je z metforminom inducirana aktivacija AMPK vzrok za inhibicijo fosforilacije mTORC1 v celicah MDA-MB-231 v hranilnem mediju z 1 g/L glukoze. Kato in sod. (2015) so pokazali, da metformin prepreči z receptorjem inzulinskega/inzulinu-podobnega ravnega dejavnika 1 inducirano aktivacijo Akt. Posledično ne pride do fosforilacije mTORC1, zato bi pričakovali, da bi metformin tudi v celicah PC-3 nekoliko znižal raven s CoCl<sub>2</sub> stabiliziranega HIF-1 $\alpha$ , vendar do tega ni prišlo (Slika 15).

#### 4.6 VPLIV INHIBICIJE KOMPLEKSA IV NA ANTIPROLIFERATIVNE UČINKE METFORMINA V KULTURI CELIC MDA-MB-231 IN PC-3

Po nekaterih podatkih visoke koncentracije metformina neposredno zavirajo proliferacijo celic MDA-MB-231 (Liu in sod., 2009). Zanimalo nas je, ali lahko antiproliferativne učinke metformina moduliramo z delovanjem na kompleks IV dihalne verige celic MDA-MB-231, katerih odzive smo primerjali z odzivi celic PC-3. Proliferativno sposobnost celic smo po 24-urni izpostavitvi različnim modulatorjem energijske presnove preverili z analizo fluorescence barvila Hoechst, ki je sorazmerna številu celic (Rajh in sod., 2016).



**Slika 16:** Ocena števila celic MDA-MB-231 in PC-3 z barvilom Hoechst po 24 urah izpostavljenosti modulatorjem energijske presnove v hranilnem mediju s serumom. Hranilni RPMI medij je vseboval 1 g/L glukoze, 2 mM glutamin in 10 % FBS. Celice smo izpostavili 10 mM oksamatu, 10 mM dikloroacetatu, 5mM metforminu, 5 mM NaCN in 250  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>. Prikazane so na kontrolo normirane povprečne vrednosti

( $\pm$ SEM) fluorescence Hoechst.  $n=6$ ,  $N=2$ . \* $p<0,05$  v primeravi s kontrolo, Dunnettov *post hoc* test. DCA: dikloroacetat, MF: metformin.

Po 24 urah smo manjšo stopnjo fluorescence barvila Hoechst glede na kontrolo zaznali v vzorcih celic MDA-MB-231 in PC-3, ki smo jih izpostavili oksamatu, dikloroacetatu in metforminu s  $\text{CoCl}_2$  (Slika 16). Upad fluorescence Hoechst glede na kontrolo je v celicah MDA-MB-231 povzročil še  $\text{CoCl}_2$ , v celicah PC-3 pa metformin z  $\text{NaCN}$  (Slika 16). 5 mM metformin po 24 urah ni zmanjšal proliferativne sposobnosti celic MDA-MB-231 in PC-3 (Slika 16), kar ni skladno z navedbami nekaterih avtorjev, ki povzemajo, da metformin uspešno prepreči rast in proliferacijo celic MDA-MB-231 (Liu in sod., 2009; Marinello in sod., 2015) in PC-3 (Kato in sod., 2015). Naši rezultati niso skladni z rezultati študije v kateri so pokazali očitni citotoksični učinek 5 mM metformina na proliferacijo MDA-MB-231 po 24 urah tretiranja v mediju z 10 % FBS in s 4,5 g/L glukoze (Marinello in sod., 2015), kar je precej višja koncentracija glukoze, kot smo jo uporabili mi. Po 48 urah pa so tak učinek zaznali še pri 30  $\mu\text{M}$  in 1 mM metforminu (Marinello in sod., 2015). Kato in sod. (2015) so po 48 urah zaznali velik upad v številu živih celic PC-3, ki so jih izpostavili 10 mM metforminu v mediju z 10 % FBS. Naši rezultati za celice PC-3, tretirane z metforminom (Slika 16) rezultatom navedene študije niso podobni, saj je tretiranje trajalo samo 24 ur, tretirali smo s 5 mM metforminom, hranilni medij pa je vseboval 1 g/L glukoze. Rezultati študije Kato in sod. (2015) bi lahko bili povezani z nizko koncentracijo glukoze v hranilnem mediju, vendar pa to ostaja nepojasnjeno, saj v članku ni jasno definirano, pri kakšni koncentraciji glukoze so celice tretirali. Do neskladij rezultatov vpliva metformina na celice lahko pride že zaradi razlik v načrtovanju poskusov (Rajh in sod., 2016). Rajh in sod. (2016) so na celicah MDA-MB-231 dokazali, da je učinek metformina precej večji, če pri dlje trajajočih poskusih (48 in 72 ur) ne menjujemo medija, saj koncentracija glukoze v mediju po 72 urah močno upade. Zaradi zaustavitve delovanja mitohondrijev z metforminom imajo celice za tvorbo ATP na voljo predvsem glukozo v mediju, če jim te zmanjka, postanejo bolj občutljive na metformin, ta pa posledično zmanjša njihovo viabilnost in proliferacijo. Na učinek metformina pomembno vpliva tudi gostota nasajenih celic; gosteje kot so celice nasajene, hitreje porabijo glukozo iz medija in večji antiproliferativni učinek metformina lahko zaznamo (Rajh in sod., 2016). Za ustrezno primerjavo rezultatov je zato pomembno, da poznamo načrt poskusa in ali je ta skladen z našo izvedbo poskusa.

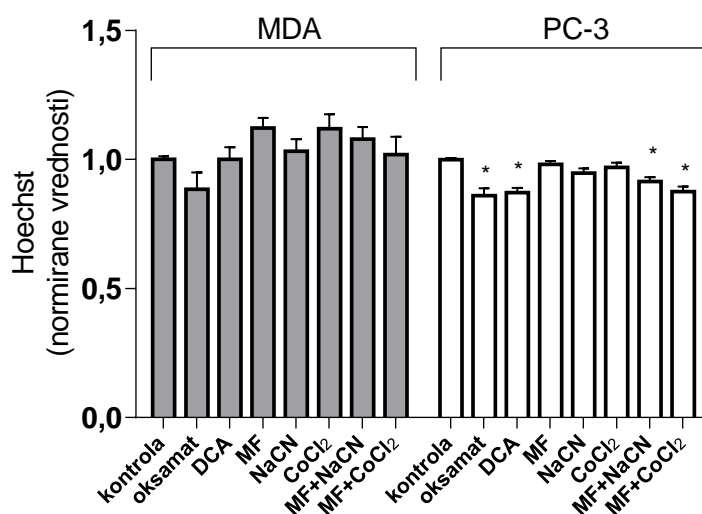
$\text{NaCN}$  ni povečal antiproliferativnega učinka metformina na celice MDA-MB-231 (Slika 16), kar ne podpira naše hipoteze, da bo inhibicija kompleksa IV ojačala učinek metformina. Metformin in  $\text{NaCN}$  posamično nista vplivala na število celic PC-3, skupaj pa sta zmanjšala njihovo število za 9 % ( $p<0,05$ ), kar bi lahko bila posledica njunega sinergističnega delovanja na dihalno verigo (sočasna inhibicija kompleksa I in kompleksa IV). Razlike v proliferativni sposobnosti celic MDA-MB-231 in PC-3 po izpostavitvi modulatorjem energijskega metabolizma bi lahko bile povezane z razlikami v metabolnem

profilu. Oksamat je uspešno zavrl proliferacijo celic MDA-MB-231 in PC-3 (Slika 16), kar navajajo tudi drugi avtorji za različne celice raka (Yang in sod., 2014; Zhai in sod., 2013; Zhao in sod., 2015). Avtorji predlagajo, da je zmanjšanje proliferativne sposobnosti celic z oksamatom povezana z zaustavitvijo celičnega cikla (Zhai in sod., 2013; Yang in sod., 2014), inhibicijo signalne poti Akt/mTORC1, zaviranjem apoptoze in spodbujanjem avtofagije (Zhao in sod., 2015).

Haugrud in sod. (2014) so v svoji študiji dokazali sinergistični učinek metformina in dikloroacetata na indukcijo programirane celične smrti v nekaterih tipih raka dojke. Pri tem so ugotovili, da je citotoksični vpliv dikloroacetata (5 mM) na nekatere tipe celic raka dojke po dveh ali štirih dneh precej manjši v primerjavi z metforminom (8 mM). Naši rezultati govorijo ravno nasprotno, saj je 10 mM dikloroacetat zmanjšal proliferativno sposobnost tako celic MDA-MB-231 kot tudi PC-3, 5 mM metformin pa ne (Slika 16). Navedene razlike med rezultati bi lahko bile povezane z razlikami v uporabljenih koncentracijah. Bonnet in sod. (2007) poudarjajo, da dikloroacetat zmanjša proliferacijo in hkrati spodbuja programirano celično smrt z depolarizacijo mitohondrijev in posredno aktivacijo kaspaz. 250  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ , ki naj bi imel v razmerah *in vitro* že citotoksičen učinek (Mobasheri in sod., 2006), je proliferacijo zavrl samo v celicah MDA-MB-231 (Slika 16). Lee in sod. (2013) so ugotovili, da  $\text{CoCl}_2$  spodbudi celično smrt matičnih celic mišjega zarodka prek delovanja na mitohondrije. 150  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  naj bi povzročil upad mitohondrijskega membranskega potenciala, sprostitve citokroma c, močno povečanje nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti in aktivacijo kaspaz. Vpliv kombinacije metformina s  $\text{CoCl}_2$  na proliferacijo celic MDA-MB-231 in PC-3 bi lahko bila posledica drastičnega upada mitohondrijskega membranskega potenciala, energijskega stresa in sprostitve citokroma c iz mitohondrija.

Z namenom, da bi *in vitro* posnemali razmere v sredici tumorja, ki je pogosto slabo prekrvljena in zato revna z ravnimi dejavniki, hranili in kisikom (Luengo in sod., 2014), smo celice MDA-MB-231 in PC-3 izpostavili različnim modulatorjem energijske presnove v hranilnem mediju brez seruma. Serum namreč zagotavlja optimalne razmere za rast celic (Pirkmajer in Chibalin, 2011), saj hranilnemu mediju dodeli puferske lastnosti, veže ali nevtralizira strupene snovi in vsebuje veliko različnih proteinov, hranil, proteinskih prenašalcev za nevdotopne snovi, hormonov ter ravnih in pritrjevalnih dejavnikov, nujnih za rast celic *in vitro* (Fetal Bovine Serum Class, 2012).





**Slika 17: Ocena števila celic MDA-MB-231 in PC-3 z barvilom Hoechst po 24 urah izpostavljenosti modulatorjem energijske presnove v hranilnem mediju brez seruma.** Hranilni RPMI medij je vseboval 1 g/L glukoze in 2 mM glutamin. Celice smo izpostavili 10 mM oksamatu, 10 mM dikloroacetatu, 5mM metforminu, 5 mM NaCN in 250  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>. Prikazane so na kontrolo normirane povprečne vrednosti ( $\pm$ SEM) fluorescence barvila Hoechst. n=12, N=4. \*p<0,05 v primeravi s kontrolo, Dunnettov *post hoc* test. DCA: dikloroacetat, MF: metformin.

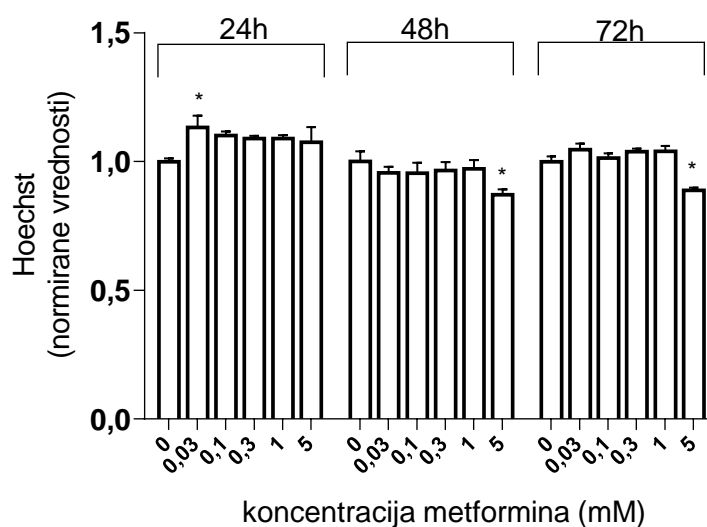
Po 24 urah so se celice MDA-MB-231 in PC-3 v mediju brez seruma precej drugače odzvale na modulatorje energijske presnove. Pri celicah MDA-MB-231 ni nobeden od modulatorjev povzročil bistvene spremembe fluorescence Hoechst glede na kontrolo (Slika 17). Čeprav smo pri poskusu zaznali majhno razliko med vplivom metformina in metformina z NaCN na celice MDA-MB-231, ta ni bila statistično značilna ( $p>0,05$ ). Pri celicah PC-3 smo potrdili sinergistični učinek inhibicije kompleksa I in IV na proliferacijo celic ( $p<0,05$ ).

Naši rezultati za vpliv 5 mM metformina na proliferativne sposobnosti celic MDA-MB-231 niso skladni z navedbami Zorodky in sod. (2014). V študiji kažejo, da je v odsotnosti seruma že 0,5 mM metformin po 48 urah občutno zmanjšal proliferacijo celic MDA-MB-231 v mediju z 1 g/L glukoze. Tak rezultat bi lahko bil posledica odsotnosti LKB1 v celicah MDA-MB-231, ki so jih uporabili v navedeni študiji, zaradi česar so te celice bolj občutljive na metformin kot naše MDA-MB-231, ki izražajo LKB1 (Rajh in sod., 2016). Poleg tega bi lahko k povečanju antiproliferativnega učinka metformina še dodatno prispeval upad koncentracije glukoze v mediju po 48 urah zaradi ne menjave medija, kar bi v celicah drastično povečalo energijski stres (Rajh in sod., 2016). Manjši upad fluorescence smo zaznali pri celicah MDA-MB-231, tretiranih z oksamatom, vendar niti ta

ni bil statistično značilen (Slika 17). Pri celicah PC-3 smo zaznali podoben vpliv modulatorjev na celice kot v prisotnosti seruma, saj so tudi v tem primeru zmanjšanje fluorescence barvila Hoechst povzročili oksamat, dikloroacetat in kombinaciji metformina z NaCN in metformina s  $\text{CoCl}_2$  (Slika 16, Slika 17).

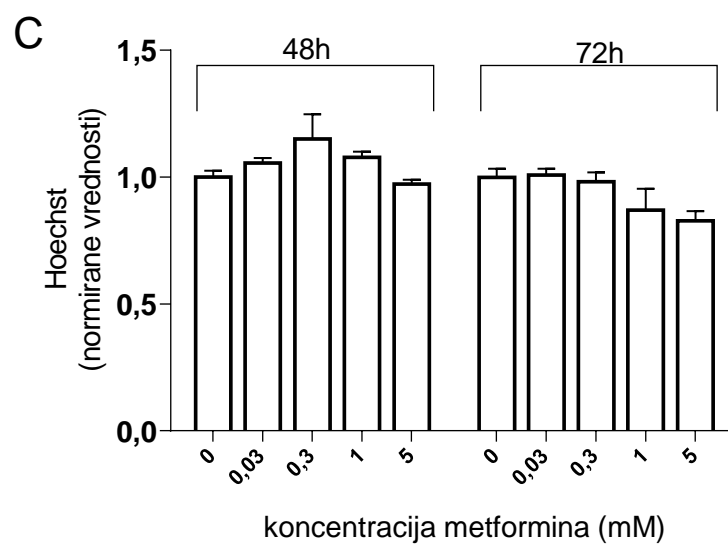
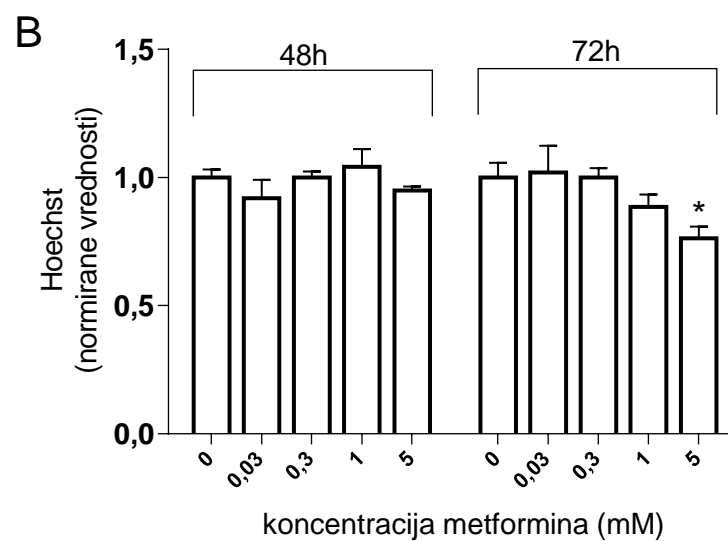
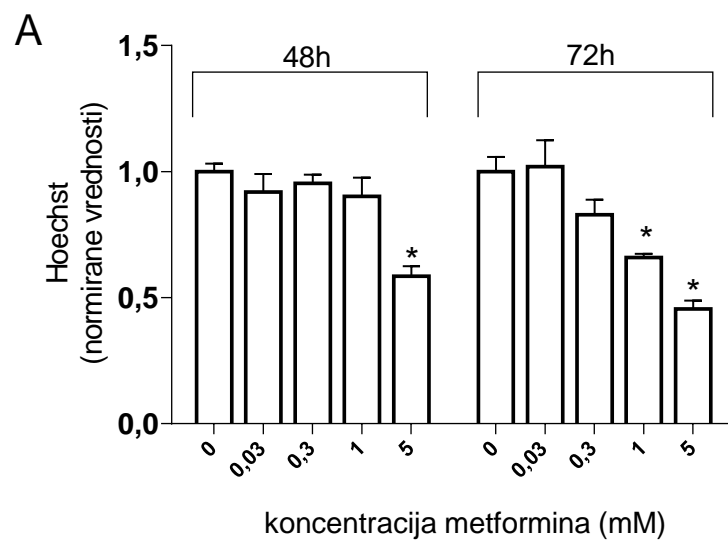
#### 4.7 VPLIV KONCENTRACIJE GLUKOZE NA ANTIPROLIFERATIVNI UČINEK METFORMINA NA CELICE PC-3

Poskusi v našem laboratoriju so pokazali, da je učinkovitost metformina kot zaviralca proliferacije celic MDA-MB-231 v veliki meri odvisna od koncentracije glukoze v mediju (Rajh in sod., 2016). Želeli smo preveriti, ali koncentracija glukoze pomembno vpliva na odziv celic PC-3 na metformin. Ker pri prejšnjem poskusu antiproliferativnega učinka metformina po 24 urah nismo zaznali, nas je zanimalo, po kolikšnem času lahko z uporabo barvila Hoechst opazimo upad števila PC-3 celic izpostavljenih metforminu.



**Slika 18: Ocena števila celic PC-3 z barvilom Hoechst po 24, 48 in 72 urah izpostavljenosti metforminu.** Celice smo 72 ur tretirali z različnimi koncentracijami metformina v popolnem mediju RPMI z 1 g/L glukoze, 2 mM glutaminom in 10 % FBS. Po 24 urah smo eno skupino celic zamrznili, ostale pa tretirali še nadaljnjih 24 ali 48 ur. Medij smo redno menjavali na 24 ur in se tako izognili vplivu pomanjkanja glukoze na učinek metformina. Prikazane so na kontrolo normirane povprečne vrednosti ( $\pm$ SEM) fluorescence barvila Hoechst.  $n=4-8$ ,  $N=1-2$ . \* $p<0,05$  v primeravi s kontrolo, Dunnettov *post hoc* test.

Zmanjšanje fluorescence barvila Hoechst smo zaznali pri celicah PC-3, ki smo jih 5 mM metforminu izpostavili za 48 in 72 ur (Slika 18). Tudi pri tem poskusu po 24 urah nismo opazili upada fluorescence Hoechst pri nobeni koncentraciji metformina (Slika 18). Po 24 urah je metformin že povzročil energijski stres v celicah PC-3, saj je aktiviral AMPK (Slika 13), vendar njegovega vpliva na ravni proliferacije še nismo opazili. V primerjavi z vplivom metformina po 48 urah, po 72 urah nismo zaznali bistveno večjega vpliva. To bi lahko razložili z reverzibilno inhibicijo kompleksa I, zaradi katere upade mitohondrijski membranski potencial, ki je gonilna sila za vstopanje metformina (Bridges in sod., 2014). Kato in sod. (2015) so predlagali mehanizem, s katerim naj bi metformin zaviral proliferacijo PC-3 celic. Ta vključuje aktivacijo signalne poti AMPK/mTORC1 in zmanjšanje izražanja receptorja za inzulin/inzulinu-podoben rastni dejavnik. V njihovi študiji je po 48 urah zmanjšanje števila živih celic glede na kontrolo povzročil že 0,5 mM metformin (Kato in sod., 2015) v hranilnem mediju z 10 % FBS. Naši rezultati se od rezultatov študije Kato in sod. (2015) nekoliko razlikujejo, saj smo upad v številu celic zaznali samo pri 5 mM metforminu (Slika 18). Vzrok za tako razliko bi lahko bila nižja koncentracija glukoze v hranilnem mediju, vendar v njihovem članku koncentracija glukoze v mediju ni jasno definirana. Če imajo celice na voljo dovolj glukoze, metformin samo upočasni stopnjo celičnih delitev, če pa je glukoze premalo, spodbudi proces celične smrti (Wheaton in sod., 2014). Z rednim menjevanjem medija smo pri svojem poskusu vzdrževali enakomerno koncentracijo glukoze. S tem smo preprečili, da bi v celicah prišlo do dodatne energijske krize, in zagotovili, da so rezultati odraz dejanskega vpliva metformina na proliferacijo celic PC-3. Kolikšen vpliv ima koncentracija glukoze v mediju na antiproliferativni učinek metformina na celice PC-3, smo preverili z zadnjim poskusom.



**Slika 19: Ocena števila celic PC-3 z barvilom Hoechst po 48 in 72 urah izpostavljenosti metforminu v mediju z različno koncentracijo glukoze.** Celice smo 72 ur tretirali z različnimi koncentracijami metformina v mediju RPMI z 2 mM glutaminom in 10 % FBS ter z (A) 0 g/L glukoze, (B) 1 g/L glukoze ali (C) 4,5 g/L glukoze. Medij smo redno menjavali na 24 ur do konca poskusa. Po 48 urah smo eno skupino celic zamrznili, ostalo pa tretirali še nadaljnjih 24 ur. Prikazane so na kontrolo normirane povprečne vrednosti ( $\pm$ SEM) fluorescence barvila Hoechst.  $n=4$ ,  $N=2$ .  $*p<0,05$  v primeravi s kontrolo, Dunnettov *post hoc* test.

Pri tem poskusu smo upoštevali ugotovitve prejšnjega poskusa, da po 24 urah z barvilom Hoechst še ne zaznamo vpliva metformina in zato celice tretirali 48 in 72 ur. Po 48 urah smo upad fluorescence barvila Hoechst zaznali samo v celicah, ki smo jih izpostavili 5 mM metforminu v mediju brez glukoze (Slika 19A). Po 72 urah je postal upad fluorescence Hoechst v mediju brez glukoze izrazitejši, nekoliko jo je znižal že 0,3 mM metformin, 1 mM in 5 mM metformin pa sta jo znižala za približno 11 oziroma 24 %. (Slika 19A). V mediju z 1 g/L glukoze je fluorescenco Hoechst znižal samo 5 mM metformin, po 72 urah (Slika 19B), v mediju s 4,5 g/L glukoze pa vpliva metformina sploh nismo zaznali (Slika 19C). Rezultati podpirajo hipotezo, da je antiproliferativni učinek metformina na celice PC-3 odvisen od koncentracije glukoze. Podoben vpliv koncentracije glukoze na učinek metformina smo v našem laboratoriju opazili že na celicah MDA-MB-231 (Rajh in sod., 2016). Ker so rakave celice energijsko odvisne predvsem od aerobne glikolize, lahko že zaradi pomanjkanja glukoze v mediju zapadejo v energijsko krizo, ki aktivira AMPK in upočasni proliferacijo. Visoka koncentracija glukoze v mediju celicam omogoči povečano stopnjo glikolize, ki lahko zasenči vpliv metformina. V mediju z visoko koncentracijo glukoze metformin ne prepreči rasti celic, stopnja fosforilacije AMPK in ACC je precej nižja in ne inhibira fosforilacije mTORC1 (Zorodky in sod., 2014).

#### 4.8 ZAKLJUČKI IN IZHODIŠČA ZA NADALJNJE RAZISKAVE

Z uporabo metformina smo tarčno delovali na glavni organel celičnega metabolizma in na celični liniji raka dojke MDA-MB-231 nedvoumno dokazali vpliv metformina na mitohondrijski potencial in tvorbo laktata. Nekateri odzivi celic MDA-MB-231 in PC-3 na različne modulatorje energijskega metabolizma so izpostavili potencialne razlike v metabolnem profilu celic. Take metabolne lastnosti posameznega tipa raka so izjemno pomembne za zdravljenje s tarčnim delovanjem na metabolizem celic, zato bi imela natančnejša karakterizacija metabolnega profila vsake celične linije velik pomen.

Zbrani rezultati kažejo na uspešnost metformina pri tarčnem delovanju na metabolizem obeh rakavih celičnih linij. Na potencialno uporabnost metformina za zdravljenje trojno negativnega tipa raka dojke ali prostate pri človeku pa brez dodatnih *in vivo* analiz ne

moremo sklepati. Celice so v tumorju izpostavljene zelo različnim okoljskim razmeram; nekatere smo poskušali posnemati v *in vitro* razmerah. Z izvedbo poskusov v *in vivo* razmerah bi lahko ugotovili, katera koncentracija metformina, ki je klinično še sprejemljiva, ima vpliv na celice MDA-MB-231. Morda ta ne bi bila tako zelo visoka glede na to, da bi k večjemu učinku metformina na tumor lahko prispeval tudi njegov sistemski učinek na organizem. Z redno analizo velikosti tumorja v živalskih modelih bi lahko ugotovili, ali metformin zgolj upočasni rast tumorja ali povzroči njegovo regresijo. S poskusi *in vivo* bi lahko preverili tudi, kakšen je vpliv metformina na raka dojke v organizmu s sladkorno boleznijo tipa 2 in kakšen v organizmu brez sledkorne bolezni.

## 5 SKLEPI

1. Celice MDA-MB-231 in PC-3 imajo delujoče mitohondrije, saj so se na modulatorje energijske presnove odzivale tako s spremembo mitohondrijskega membranskega potenciala kot tudi s spremembo aktivnosti Krebsovega cikla. Metformin je po 24 urah znižal mitohondrijski membranski potencial celic MDA-MB-231. Velikost znižanja mitohondrijskega membranskega potenciala pa je bila odvisna od koncentracije metformina. S tem smo potrdili prvo hipotezo, da metformin zmanjša mitohondrijski membranski potencial v celicah MDA-MB-231.
2. Metformin je v celicah MDA-MB-231 in PC-3 pospešil nastajanje laktata, kar potrjuje drugo hipotezo. Oksamat, ki zaustavi aerobno glikolizo, je močno zavrl nastajanje laktata, zato sklepamo, da je z metforminom pospešeno nastajanje laktata posledica povečane stopnje aerobne glikolize.
3. V celicah MDA-MB-231 metformin ni bistveno spodbudil aktivacije AMPK. Dodatek inhibitorja kompleksa IV dihalne verige je vpliv metformina na AMPK precej spodbudil, kar sicer nakazuje na sinergistični učinek, ki ga pa nismo z zagotovostjo potrdili. Tako pri metforminu samem kot pri kombinaciji z NaCN je AMPK povečala fosforilacijo ACC in razlik na tej ravni ni bilo. V celicah PC-3 je metformin sam bistveno spodbudil aktivacijo AMPK, dodatek NaCN pa njegovega vpliva ni povečal. S tem ne moremo potrditi tretje hipoteze, da inhibicija kompleksa IV dihalne verige poveča z metforminom spodbujeno aktivacijo AMPK v celicah MDA-MB-231 in PC-3.
4. Metformin je delno zavrl s kemično hipoksijo inducirano stabilizacijo transkripcijskega dejavnika HIF-1 $\alpha$  samo v celicah MDA-MB-231, v celicah PC-3 pa ne. Ta rezultat kaže na biološke razlike med celicami različnih vrst raka. Četrta hipoteza, da metformin zavira indukcijo transkripcijskega dejavnika HIF-1 $\alpha$ , torej ne drži za vse vrste raka.
5. Na proliferacijsko sposobnost celic MDA-MB-231 v mediju s serumom, metformin ni imel bistvenega vpliva, dodatek NaCN pa njegovega antiproliferativnega učinka ni povečal. Čeprav ni imel metformin niti v mediju brez seruma pomembnega antiproliferativnega učinka na celice MDA-MB-231, je dodatna inhibicija kompleksa IV malenkost povečala njegov učinek. Tudi pri celicah PC-3 metformin sam ni imel izrazitega antiproliferativnega učinka, v kombinaciji z NaCN pa je bil njegov negativen vpliv na proliferacijo zelo očiten. Ta rezultat ponovno kaže na različne biološke in presnovne značilnosti rakavih celic. Peto hipotezo, o povečanju antiproliferativnega učinka metformina z inhibicijo kompleksa IV dihalne verige, lahko torej potrdimo samo za celice PC-3.

6. Antiproliferativni učinek metformina na celice PC-3 je deloma odvisen od časa izpostavljenosti ter od koncentracije glukoze v hranilnem mediju. S tem smo potrdili šesto hipotezo, da je antiproliferativni učinek metformina na celice PC-3 odvisen od koncentracije glukoze.



## 6 POVZETEK

Številne epidemiološke in eksperimentalne študije so nakazale potencialno uporabnost metformina, ki se sicer uporablja za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2 za preprečevanje ali zdravljenje raka dojke. Mehanizem delovanja metformina, s katerim bi zavrl razvoj raka dojke, še ni povsem jasno opredeljen. K temu bi lahko pripomogel s sistemskim vplivom na koncentracijo glukoze in inzulina v krvi in/ali z neposrednim vplivom na mitohondrije celic raka, kjer naj bi inhibiral kompleks I dihalne verige. V raziskavah je bilo dokazano, da z inhibicijo dihalne verige depolarizira mitohondrije in povzroči energijsko krizo, zaradi katere se aktivirajo različne signalne poti, ki preprečijo energijsko iztrošenje celice in spodbujajo preživetje.

Za protirakav vpliv metformina na celično linijo trojno-negativnega raka dojke MDA-MB-231 je med rezultati obstoječih študij precej neskladij. Trojno negativni rak dojke je ena najbolj agresivnih oblik, ki večinoma prizadene mlajše ženske, uspešnost zgodnjega odkrivanja in zdravljenja pa je nizka. Obstoječe *in vitro* in nekatere *in vivo* študije kažejo precejšen vpliv metformina na zaustavitev proliferacije in spodbujanje celične smrti tega tipa raka dojke, spet druge pa to zanikajo. V magistrski nalogi smo zato želeli opredeliti učinke metformina na energijsko presnovo celic raka dojke MDA-MB-231 in jih primerjati z učinki na celice raka prostate PC-3.

Z uporabo fluorescentnega kationskega barvila TMRM smo posredno izmerili mitohondrijski membranski potencial celic MDA-MB-231 in PC-3 po izpostavitvi različnim modulatorjem energijskega metabolizma ter ovrednotili delovanje mitohondrijev. Pri celicah MDA-MB-231 je metformin povzročil upad mitohondrijskega membranskega potenciala, kar potrjuje našo hipotezo in dokazuje njegov vpliv na dihalno verigo. S kolorimetričnim testom za merjenje aktivnosti fumaraze smo potrdili vpliv metformina tudi na Krebsov cikel, saj je povzročil upad aktivnosti fumaraze v obeh celičnih linijah. Z encimskim testom za določanje koncentracije laktata v mediju smo pod vplivom metformina zaznali povečano nastajanje laktata v obeh celičnih linijah, kar je skladno z našo hipotezo. Z metforminom spodbujena aerobna glikoliza je najverjetneje posledica aktivacije AMPK zaradi energijskega stresa, ki smo ga dokazali z uporabo prenosa western. S to metodo smo v vzorcih celic detektirali fosforilirano obliko AMPK in ACC, HIF-1 $\alpha$  ter endogeni kontroli GAPDH in aktin. Z uporabo modulatorjev energijskega metabolizma smo učinkovali na metabolizem celic, pri tem pa smo opazili, da izbrani endogeni kontroli nista najbolj primerni za normiranje podatkov, saj so modulatorji deloma vplivali tudi na njuno izražanje. Metformin je spodbudil fosforilacijo in aktivacijo AMPK v obeh celičnih linijah, predvidevali pa smo, da bo inhibicija kompleksa IV z NaCN njegov učinek še povečala. Njun sinergistični učinek na celice MDA-MB-231 je bil premajhen, da bi ga nedvomno potrdili, vendar ga vseeno ne smemo zanemariti. Z metodo prenosa western smo potrdili predpostavko, da metformin v celicah raka dojke preprečuje

stabilizacijo HIF-1 $\alpha$  inducirane s kemično hipoksijo, v celicah PC-3 pa tega nismo zaznali. Z uporabo fluorescentnega barvila Hoechst smo opazili, da metformin po 24 urah ni imel bistvenega vpliva na proliferacijo celic MDA-MB-231 in PC-3. S predpostavko, da bo inhibicija kompleksa IV z NaCN povečala antiproliferativni učinek metformina, so nedvomno skladni rezultati za PC-3 celice, pri MDA-MB-231 pa smo opazili majhen učinek samo v mediju brez seruma. Z analizo preživetja celic smo ugotovili, da je vpliv metformina na celice PC-3 odvisen od koncentracije in časa tretiranja, predvsem pa od koncentracije glukoze v mediju.

Zbrani rezultati sicer kažejo na uspešnost metformina pri tarčnem delovanju na metabolizem obeh rakavih celičnih linij, vendar na potencialno uporabnost za zdravljenje raka dojke ali prostate na podlagi teh rezultatov ne moremo sklepati. Nekateri odzivi celic MDA-MB-231 in PC-3 na različne modulatorje energijskega metabolizma so izpostavili potencialne razlike v metabolnem profilu celic. Take metabolne lastnosti posameznega tipa raka so izjemno pomembne za zdravljenje s tarčnim delovanjem na metabolizem celic, zato bi imela natančnejša karakterizacija metabolnega profila vsake celične linije velik pomen.

## 7 VIRI

- Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2009. Essential cell biology. 3<sup>rd</sup> ed. New York, Garland Science: 731 str.
- American Type Culture Collection (ATCC). 2014. ATCC®CRL-1435. [http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1435.aspx?geo\\_country=si](http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1435.aspx?geo_country=si) (15. jan. 2016)
- American Type Culture Collection (ATCC). 2014. ATCC®CRM-HTB-26. <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRM-HTB-26.aspx> (15. jan. 2016)
- American Type Culture Collection (ATCC): Triple Negative Breast Cancer Panels. <http://www.lgcstandards-atcc.org/~media/03E3D0D9F0C74FE593CE7D010F982CA2.ashx> (15. jan. 2016)
- Andrzejewski S., Gravel S. P., Pollak M., St-Pierre J. 2014. Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics. *Cancer & Metabolism*, 2, 12: 1-14
- Barbosa I. A., Machado N. G., Skildum A. J., Scott P. M., Oliveira P. J. 2012. Mitochondrial remodeling in cancer metabolism and survival: Potential for new therapies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1826, 1: 238-254
- Bardella C., Olivero M., Lorenzato A., Geuna M., Adam J., O'Flaherty L., Rustin P., Tomlinson I., Pollard P. J., Di Renzo M. F. 2012. Cells lacking the fumarase tumor suppressor are protected from apoptosis through a hypoxia-inducible factor-independent, AMPK-dependent mechanism. *Molecular and cellular biology*, 32, 15: 3081-3094
- Barron C. C., Bilan P. J., Tsakiridis T., Tsiani E. 2016. Facilitative glucose transporters: Implications for cancer detection, prognosis and treatment. *Metabolism: clinical and experimental*, 65, 2: 124-139
- Bhat T. A., Kumar S., Chaudhary A. K., Yadav N., Chandra D. 2015. Restoration of mitochondria function as a target for cancer therapy. *Drug Discovery Today*, 20, 5: 635-643
- Blocking Buffers for Western Blotting and ELISA. 2015. ZDA, ThermoFisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/blocking-buffers-western-blot-elisa.html> (15. jan. 2016)
- Bonnet S., Archer S. L., Allalunis-Turner J., Haromy A., Beaulieu C., Thompson R., Lee C. T., Lopaschuk G. D., Puttagunta L., Bonnet S., Harry G., Hashimoto K., Porter C. J.,

- Andrade M. A., Thebaud B., Michelakis E. D. 2007. A mitochondria-K<sup>+</sup> channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell*, 11, 1: 37-51
- Bridges H. R., Jones A. J., Pollak M. N., Hirst J. 2014. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *The Biochemical Journal*, 462, 3: 475-487
- Cai H., Wahajuddin M., Alluri R.V., Everett R. S., Thakker D. R. Cation-selective transporters are critical determinants of the anti-proliferative effects of metformin in breast cancer cells. Poster. North Carolina Translational and Clinical Science Institute. <https://pharmacy.unc.edu/files/2015/06/cation-selective-transporters.pdf> (28. mar. 2016)
- Cairns R. A., Harris I. S., Mak T. W. 2011. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature reviews Cancer*, 11, 2: 85-95
- Carracedo A., Cantley L. C., Pandolfi P. P. 2013. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nature reviews: Cancer*, 13, 4: 227-232
- Chandel N. 2014. Four key questions about metformin and cancer. *BMC Biology*, 12:85, doi: 10.1186/s12915-014-0085-1: 3 str.
- Chang L., Chiang S. H., Saltiel A. R. 2004. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Molecular medicine*, 10, 7-12: 65-71
- Chemiluminescent Western Blotting. 2015. ZDA, ThermoFisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemiluminescent-western-blotting.html> (7. dec. 2015)
- Chen X., Qian Y., Wu S. 2015. The Warburg effect: evolving interpretations of an established concept. *Free radical biology & medicine*, 79: 253-263
- Chiaradonna F., Moresco R. M., Airoidi C., Gaglio D., Palorini R., Nicotra F., Messa C., Alberghina L. 2012. From cancer metabolism to new biomarkers and drug targets. *Biotechnology Advances*, 30, 1: 30-51
- Dakubo G. D. 2010. *Mitochondrial Genetics and Cancer*. Berlin, Springer-Verlag: 356 str.
- Emami Riedmaier A., Fisel P., Nies A. T., Schaeffeler E., Schwab M. 2013. Metformin and cancer: From the old medicine cabinet to pharmacological pitfalls and prospects. *Trends in pharmacological sciences*, 34, 2: 126-135

- Faubert B., Boily G., Izreig S., Griss T., Samborska B., Dong Z., Dupuy F., Chambers C., Fuerth B. J., Viollet B., Mamer O. A., Avizonis D., DeBerardinis R. J., Siegel P. M., Jones R. G. 2013. AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth in vivo. *Cell metabolism*, 17, 1: 113-124
- Faubert B., Vincent E. E., Poffenberger M. C., Jones R.G. 2015. The AMP-activated protein kinase (AMPK) and cancer: Many faces of a metabolic regulator. *Cancer letters*, 356: 165-170
- Fetal Bovine Serum Class. 2012. ZDA, Biological Industries.  
[http://www.bioind.com/page\\_13630](http://www.bioind.com/page_13630) (25. jan. 2016)
- Foretz M., Guigas B., Bertrand L., Pollak M., Viollet B. 2014. Metformin: From mechanisms of action to therapies. *Cell metabolism*, 20, 6: 953-166
- Fullerton M. D., Galic S., Marcinko K., Sikkema S., Pulinilkunnil T., Chen Z. P., O'Neill H. M., Ford R. J., Palanivel R., O'Brien M., Hardie D. G., Macaulay S. L., Schertzer J. D., Dyck J. R., van Denderen B. J., Kemp B. E., Steinberg G. R. 2013. Single phosphorylation sites in ACC1 and ACC2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. *Nature medicine*, 19, 12: 1649-1654
- Fumarase Activity Colorimetric Assay Kit. 2015. ZDA, BioVision.  
<http://www.biovision.com/fumarase-activity-colorimetric-assay-kit-8229.html> (7. dec. 2015)
- General western blot protocol. Anglija, abcam®.  
<http://www.abcam.com/protocols/general-western-blot-protocol> (20. jan. 2016)
- Glycolysis. 2012. Herbalzym.  
<http://www.herbalzym.com/2012/09/anti-tumor-activity-of-herbalzym-vinegar-by-disrupting-cancer-cell%E2%80%99s-metabolism/> (18. jan. 2016)
- Gogvadze V., Zhivotovsky B., Orrenius S. 2010. The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells. *Molecular aspects of medicine*, 31, 1: 60-74
- Gong S., Lu X., Xu Y., Swiderski C. F., Jordan C. T., Moscow J. A. 2002. Identification of OCT6 as a novel organic cation transporter preferentially expressed in hematopoietic cells and leukemias. *Experimental hematology*, 30, 10: 1162-1169
- Graham G. G., Punt J., Arora M., Day R. O., Doogue M. P., Duong J. K., Furlong T. J., Greenfield J. R., Greenup L. C., Kirkpatrick C. M., Ray J. E., Timmins P., Williams K. M. 2011. Clinical pharmacokinetics of metformin: *Clinical pharmacokinetics*, 50, 2: 81-98

- Hao W., Chang C. P., Tsao C. C., Xu J. 2010. Oligomycin-induced bioenergetic adaptation in cancer cells with heterogeneous bioenergetic organization. *The Journal of biological chemistry*, 285, 17: 12647-12654
- Hardie D. G. 2011. AMP-activated protein kinase – an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes and development*, 25, 18: 1895-1908
- Hardie D. G. 2015. AMPK: positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis. *Current opinion in cell biology*, 33: 1-7
- Haugrud A. B., Zhuang Y., Coppock J. D., Miskimins W. K. 2014. Dichloroacetate enhances apoptotic cell death via oxidative damage and attenuates lactate production in metformin-treated breast cancer cells. *Brest Cancer Research and Treatment*, 147, 3: 539-550
- Hoechst 33342 Solution: Technical Data Sheet. 2014. ZDA, BD Biosciences. <http://www.bdbiosciences.com/ds/pm/tds/561908.pdf> (7. dec. 2015)
- Jeon S. M., Hay N. 2012. The dark face of AMPK as an essential tumor promoter. *Cellular Logistics*, 2, 4: 197-202
- Jeon S. M., Chandel N. S., Hay N. 2012. AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature*, 485, 7400: 661–665
- Johnson M. Loading controls for Western Blots. 2015. ZDA, Labome. <http://www.labome.com/method/Loading-Controls-for-Western-Blots.html#ref7> (1. feb. 2016)
- Kalender A., Selvaraj A., Kim S. Y., Gulati P., Brûlé S., Viollet B., Kemp B. E., Bardeesy N., Dennis P., Schlager J. J., Marette A., Kozma S. C., Thomas G. 2010. Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell metabolism*, 11, 5: 390-401
- Kato H., Sekine Y., Furuya Y., Miyazawa Y., Koike H., Suzuki K. 2015. Metformin inhibits the proliferation of human prostate cancer PC-3 cells via the downregulation of insulin-like growth factor 1 receptor. *Biochemical and biophysical research communications*, 461, 1: 115-121
- Laemmli 2× Concentrate. 2016. ZDA, Sigma-Aldrich. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s3401?lang=en&region=SI> (18. jan. 2016)
- Lee J. H., Choi S. H., Baek M. W., Kim M. H., Kim H. J., Kim S. H., Oh S. J., Park H. J., Kim W. J., Jung J. Y. 2013. CoCl<sub>2</sub> induces apoptosis through the mitochondria- and

- death receptor-mediated pathway in the mouse embryonic stem cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 379, 1-2: 133-140
- Liu B., Fan Z., Edgerton S. M., Deng X. S., Alimova I. N., Lind S. E., Thor A. D. 2009. Metformin induces unique biological and molecular responses in triple negative breast cancer cells. *Cell Cycle*, 8, 13: 2031-2040
- Loboda A., Jozkowicz A., Dulak J. 2010. HIF-1 and HIF-2 transcription factors – similar but not identical. *Molecules and cells*, 29, 5: 453-442
- Lu J., Tan M., Cai Q. 2015. The Warburg effect in tumor progression: Mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Letters*, 356: 156-164
- Luengo A., Sullivan L. B., Vander Heiden M. G. 2014. Understanding the complex-ity of metformin action: Limiting mitochondrial respiration to improve cancer therapy. *BMC Biology*, 12, 82: 1-4
- Marinello P. C., da Silva T. N., Panis C., Neves A. F., Machado K. L., Borges F. H., Guarnier F. A., Bernardes S. S., de-Freitas-Junior J. C., Morgado-Díaz J. A., Luiz R. C., Cecchini R., Cecchini A. L. 2015. Mechanism of metformin action in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells involves oxidative stress generation, DNA damage, and transforming growth factor  $\beta$ 1 induction. *Tumour biology*, DOI 10.1007/s13277-015-4395-x: 10 str.
- Martin-Requero A., Ayuso M. S., Parrilla R. 1986. Rate-limiting steps for hepatic gluconeogenesis: Mechanism of oxamate inhibition of mitochondrial pyruvate metabolism. *The Journal of biological chemistry*, 261, 30: 13973-13978
- Martínez-Reyes I., Diebold L. P., Kong H., Schieber M., Huang H., Hensley C. T, Mehta M. M., Wang T., Santos J. H., Woychik R., Dufour E., Spelbrink J. N., Weinberg S. E. Zhao Y., DeBerardinis R. J., Chandel N. S. 2016. TCA cycle and mitochondrial membrane potential are necessary for diverse biological functions. *Molecular Cell*, 61: 1-11
- MDA-MB-231/GFP Cell line: Product data sheat. 2015. ZDA, Cell Biolabs. <http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/AKR-201-gfp-mda-231-cell-line.pdf> (15. jan. 2016)
- Mobasheri A., Platt N., Thorpe C., Shakibaei M. 2006. Regulation of 2-deoxy-D-glucose transport, lactate metabolism, and MMP-2 secretion by the hypoxia mimetic cobalt chloride in articular chondrocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1091: 83-93

- Nies A. T., Koepsell H., Damme K., Schwab M. 2011. Organic cation transporters (OCTs, MATEs), in vitro and in vivo evidence for the importance in drug therapy. *Handbook of experimental pharmacology*, 201: 105-167
- Perry S. W., Norman J. P., Barbieri J., Brown E. B., Gelbard H. A. 2011. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *BioTechniques*, 50, 2: 98-115
- Pirkmajer S., Chibalin A. V. 2011. Serum starvation: caveat emptor. *American journal of physiology. Cell physiology*, 301, 2: 272-279
- Pirkmajer S., Filipović D., Marš T., Miš K., Grubič Z. 2010. HIF-1 $\alpha$  response to hypoxia is functionally separated from the glucocorticoid stress response in the in vitro regenerating human skeletal muscle. *American journal of physiology: Regulatory, integrative and comparative physiology*, 299, 6: 1693-1700
- Podo F., Buydens L. M., Degani H., Hilhorst R., Klipp E., Gribbestad I. S., Van Huffel S., van Laarhoven H. W., Luts J., Monleon D., Postma G. J., Schneiderhan-Marra N., Santoro F., Wouters H., Russnes H. G., Sørli T., Tagliabue E., Børresen-Dale A. L. 2010. Triple-negative breast cancer: Present challenges and new perspectives. *Molecular Oncology*, 4, 3: 209-229
- Pollak M. 2014. Repurposing biguanides to target energy metabolism for cancer treatment. *Nature Medicine*, 20, 6: 591-593
- Pollak M. N. 2012. Investigating metformin for cancer prevention and treatment: The end of the beginning. *Cancer Discovery*, 2, 9: 778-790
- Porro L. J., Mrazek A. A., Washington T. M., Chao C. 2014. Triple negative breast cancer: A review of clinicopathologic characteristics and treatment options. *The Open Breast Cancer Journal*, 6: 1-8
- Rajh M., Dolinar K., Miš K., Pavlin M., Pirkmajer S. 2016. Medium renewal blocks anti-proliferative effects of metformin in cultured MDA-MB-231 breast cancer cells. *Plos One*, 11(5): e0154747. doi: 10.1371/journal.pone.0154747: 18 str.
- Rak v Sloveniji 2012: Epidemiologija in register raka. 2015. Ljubljana, Onkološki inštitut. [http://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/dokumenti/RRS/LP\\_2012.pdf](http://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/dokumenti/RRS/LP_2012.pdf) (12. mar. 2016)
- Shchepina L. A., Pletjushkina O. Y., Avetisyan A. V., Bakeeva L. E., Fetisova E. K., Izyumov D. S., Saprunova V. B., Vyssokikh M. Y., Chernyak B. V., Skulachev V. P. 2002. Oligomycin, inhibitor of the F<sub>0</sub> part of H<sup>+</sup>-ATP-synthase, suppresses the TNF-induced apoptosis. *Oncogene*, 21, 53: 8149-8157



- Semenza G. L. 2010. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene*, 29, 5: 625-634
- Semenza G. L. 2013. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *The Journal of clinical investigation*, 123, 9: 3664-3671
- Shaw R. J. 2006. Glucose metabolism and cancer. *Current opinion in cell biology*, 18, 6: 598-608
- Sirover M. A. 2012. Subcellular dynamics of multifunctional protein regulation: Mechanisms of GAPDH intracellular translocation. *Journal of cellular biochemistry*, 113, 7: 2193-2200
- Stockwin L. H., Yu S. X., Borgel S., Hancock C., Wolfe T. L., Phillips L. R., Hollingshead M. G., Newton D. L. 2010. Sodium dichloroacetate selectively targets cells with defects in the mitochondrial ETC. *International journal of cancer*, 127, 11: 2510-2519
- Sullivan L.B., Gui D. Y., Hosios A. M., Bush L. N., Freinkman E., Vander Heiden M. G. 2015. Supporting aspartate biosynthesis is an essential function of respiration in proliferating cells. *Cell*, 162, 3: 552-563
- Svensson R. U., Shaw R. J. 2012. Cancer metabolism: Tumour friend or foe. *Nature*, 485: 590-591
- Šmerc A., Sodja E., Legiša M. 2011. Posttranslational modification of 6-phosphofructo-1-kinase as an important feature of cancer metabolism. *PloS One*, 6(5):e19645. doi: 10.1371/journal.pone.0019645: 12 str.
- Tadakawa M., Takeda T., Li B., Tsuiji K., Yaegashi N. 2015. The anti-diabetic drug metformin inhibits vascular endothelial growth factor expression via the mammalian target of rapamycin complex 1/hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  signaling pathway in ELT-3 cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 399: 1-8
- Talks K. L., Turley H., Gatter K. C., Maxwell P. H., Pugh C. W., Ratcliffe P. J., Harris A. L. 2000. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *The American journal of pathology*, 157, 2: 411-421
- Tan W., Colombini M. 2007. VDAC closure increases calcium ion flux. *Biochimica et biophysica acta*, 1768, 10: 2510-2515
- UniProtKB. 2014a. EGFR\_HUMAN, Swiss-Prot.  
<http://www.uniprot.org/uniprot/P00533#function> (24. jun. 2016)

UniProtKB. 2014b. ERBB2\_HUMAN, Swiss-Prot.

<http://www.uniprot.org/uniprot/P04626> (24. jun. 2016)

Viollet B., Guigas B., Sanz Garcia N., Leclerc J., Foretz .M, Andreelli F. 2012. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical Science*, 122, 6: 253-270

Wallace D. C. 2012. Mitochondria and cancer. *Nature reviews Cancer*, 12, 10: 685-698

Wang Z. Y., Loo T. Y., Shen J. G., Wang N., Wang D. M., Yang D. P., Mo S. L., Guan X. Y., Chen J. P. 2012. LDH-A silencing suppresses breast cancer tumorigenicity through induction of oxidative stress mediated mitochondrial pathway apoptosis. *Breast cancer research and treatment*, 131, 3: 791-800

Ward P. S., Thompson C. B. 2012. Metabolic reprogramming: A cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell*, 21, 3: 297-308

Wheaton W. W., Weinberg S. E., Hamanaka R. B., Soberanes S., Sullivan L. B., Anso E., Glasauer A., Dufour E., Mutlu G. M., Budigner G. S., Chandel N. S. 2014. Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *eLife*, 13, 3: e02242, doi: 10.7554/eLife.02242: 18 str.

Wyatt C. N., Buckler K. J. 2004. The effect of mitochondrial inhibitors on membrane currents in isolated neonatal rat carotid body type I cells. *The Journal of physiology*, 556: 175-191

Yang Y., Su D., Zhao L., Zhang D., Xu J., Wan J., Fan S., Chen M. 2014. Different effects of LDH-A inhibition by oxamate in non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget*, 5, 23: 11886-11896

Yuan Y., Hilliard G., Ferguson T., Millhorn D. E. 2003. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha. *The Journal of biological chemistry*, 278, 18: 15911-15916

Zhai X., Yang Y., Wan J., Zhu R., Wu Y. 2013. Inhibition of LDH-A by oxamate induces G2/M arrest, apoptosis and increases radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells. *Oncology reports*, 30, 6: 2983-2991

Zhang Y., Damery E. F., Everett R. S., Bae-Jump V. L, Thakker D. R. 2012. Cation-selective transporters are critical in the efficacy of metformin against breast and endometrial cancer. Poster. North Carolina Translational and Clinical Research Sciences Institute.

<https://pharmacy.unc.edu/files/2015/06/Janes-final-AAPS-2012-poster.pdf> (28. mar. 2016)

Zhang D., Fei Q., Li J., Zhang C., Sun Y., Zhu C., Wang F., Sun Y. 2016. 2-Deoxyglucose reverses the promoting effect of insulin on colorectal cancer cells in vitro. *PloS One*, 11(3): e0151115, doi: 10.1371/journal.pone.0151115: 14 str.

Zhao Z., Han F., Yang S., Wu J., Zhan W. 2015. Oxamate-mediated inhibition of lactate dehydrogenase induces protective autophagy in gastric cancer cells: Involvement of the Akt-mTOR signaling pathway. *Cancer Letters*, 358, 1: 17-26

Zhuang Y., Miskimins W. K. 2011. Metformin induces both caspase-dependent and poly(ADP-ribose) polymerase-dependent cell death in breast cancer cells. *Molecular cancer research*, 9, 5: 603-615

Zordoky B. N., Bark D., Soltys C. L., Sung M. M., Dyck J. R. 2014. The anti-proliferative effect of metformin in triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells is highly dependent on glucose concentration: Implications for cancer therapy and prevention. *Biochimica et biophysica acta*, 1840, 6: 1943-1957

## ZAHVALA

Mentorju doc. dr. Sergeju Pirkmajerju se iskreno zahvaljujem za strokovno pomoč, razpoložljivost, vse koristne in poučne nasvete tako pri delu v laboratoriju kot tudi pri izdelavi magistrske naloge. Hvala za temeljit pregled magistrske naloge in ne nazadnje za izkazano zaupanje ob dani možnosti nadaljnega raziskovalnega dela.

Hvala doc. dr. Mojci Pavlin za sprejem v svojo projektno skupino in s tem uresničitev želje po raziskovanju na področju metabolizma rakavih celic.

Posebna zahvala gre Klemnu Dolinarju in Maruši Rajh za poučno in zanimivo uvajanje, pozitivno energijo in sproščenost. Hvala za prilagodljivost, podporo, vse uporabne nasvete, pomoč pri zasnovi in izvedbi poskusov ter za vse posredovane zanimive članke. Hvala tudi znanst. sod. dr. Katarini Miš in asist. dr. Urški Matkovič za vse nasvete in sproščeno vzdušje.

Iskreno se zahvaljujem družini in Damjanu za vso podporo in pomoč, razumevanje, spodbudne besede in lepe trenutke.