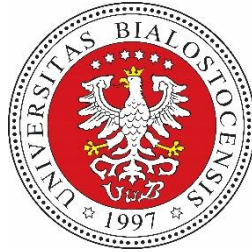


**Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Biologiczno-Chemiczny
Instytutu Biologii**



Magdalena Siemieniuk

**Metaboliczne uwarunkowania odpowiedzi na oksytiaminę
komórek nowotworowych oraz grzybów
drożdżopodobnych**

Rozprawa doktorska

Wykonana w Instytucie Biologii na
Wydziale Biologiczno-Chemicznym
Uniwersytetu w Białymstoku
Promotor rozprawy: dr hab. Adam Michał Tylicki

Białystok rok 2016

2. STRESZCZENIE

Tiamina, jedna z kluczowych cząsteczek metabolizmu dla zwierząt i człowieka jest substancją egzogenną dostarczaną wraz z pokarmem. Syntetyzują ją bakterie, rośliny i grzyby. Najlepiej poznano funkcję difosforanu tiaminy, który jest koenzymem tak istotnych dla bioenergetyki enzymów jak mitochondrialne kompleksy dehydrogenaz pirogronianowej i 2-oksogluutaranowej oraz cytozolowej transketolazy. Funkcje pozostałych pochodnych fosforanowych tiaminy nie zostały całkowicie wyjaśnione. Postuluje się, że trifosforan tiaminy oraz adenozyntrifosforan tiaminy mogą uczestniczyć w odpowiedzi komórek na czynniki stresowe. Ponadto trifosforan tiaminy może być donorem grup fosforanowych podczas fosforylacji białek.

Niedobory tiaminy mają poważne negatywne konsekwencje dla komórek i organizmów. U ludzi braki tiaminy prowadzą do dysfunkcji układu nerwowego, lokomotorycznego i chorób ogólnometabolicznych. Istotna rola pełniona przez tiaminę i poważne konsekwencje jej niedoborów predestynują procesy z jej udziałem jako potencjalne cele farmakologicznej modyfikacji metabolizmu różnych biologicznych czynników patogennych. W tym celu można wykorzystać antywitaminowe pochodne tiaminy takie jak oksytiamina, tetrahydrotiamina, tetrahydrooksytiamina, amprolium lub tiochrom, które dzięki podobieństwu do naturalnej witaminy mogą zaburzać procesy metaboliczne zależne od witaminy B₁.

Wyniki wcześniejszych badań wykazały, że oksytiamina wywiera hamujące działanie na wzrost *Saccharomyces cerevisiae* pomimo tego, że komórki te są zdolne do syntezy tiaminy *de novo*. Skłoniło mnie to do poszukiwania odpowiedzi na pytanie czy niezdolność do syntezy endogennej tiaminy zwiększa podatność na działanie oksytiaminy oraz podjęcia próby porównania wywoływanych efektów i mechanizmów działania tej antywitaminsy w dwóch modelach komórkowych: modelu komórek syntetyzujących tiaminę *de novo* oraz nie

mającym takich zdolności. Pierwszy, model komórek grzybowych, reprezentujący komórki syntetyzujące tiaminę, stanowiły: *S. cerevisiae*, *Candida albicans* oraz *Malassezia pachydermatis*. Drugi model komórek nowotworowych stanowiły niezdolne do syntezy tiaminy trzy linie komórkowe: raka szyjki macicy HeLa-C oraz raka piersi MCF-7 i MDA-MB-231. Taki dobór modeli pozwolił zarówno na ocenę potencjału cytotoksycznego badanych pochodnych tiaminy jak również badanie metabolicznych uwarunkowań odpowiedzi komórek obu modeli w zależności od zdolności do syntezy tiaminy i uwarunkowań ogólnometabolicznych modelu.

Wstępny eksperyment w modelu komórek grzybowych wykazał, że jedynie oksytiamina powodowała istotne ograniczenie tempa wzrostu komórek, w związku z tym w dalszych eksperymentach skupiłam się na jej działaniu. W badaniach wykorzystałam standardowe testy stosowane do oceny cytotoksyczności oksytiaminy w modelu komórek grzybowych (oznaczenie wartości MIC oraz MCF) i modelu komórek nowotworowych (test MTT). W celu bezpośredniego porównania obu modeli wyznaczyłam wartość GI_{50} . Potencjał oksytiaminy w zwalczaniu środowiskowych szczepów *M. pachydermatis* oszacowałam dodatkowo stosując testy dyfuzyjno-krażkowe w porównaniu z ketokonazolem. Ocenę metabolicznych efektów działania oksytiaminy wykonałam poprzez oznaczenie aktywności enzymów charakterystycznych dla przemian oksydacyjnych (dehydrogenaza jabłczanowa – w obu modelach), fermentacyjnych (dehydrogenaza mleczanowa, dekarboksylaza pirogronianowa – w zależności od modelu) i cyklu glioksalanowego (liaza cytrynianowa w modelu komórek grzybowych). Metodą *Real-Time* PCR oceniłam wpływ oksytiaminy na ekspresję genów kodujących oznaczane enzymy. Zmiany relacji pomiędzy tiaminą a jej fosforanowymi pochodnymi pod wpływem oksytiaminy w obu modelach oznaczyłam z wykorzystaniem techniki HPLC, natomiast reakcję na poziomie profili

lipidowych zbadalam wykorzystujac technike chromatografii cienkowarstwowej i chromatografii gazowej.

W modelu komorek grzybowych najwyzsza wzraliwosc na oksytiamine wykazala *M. pachydermatis*. Wartości MFC i GI₅₀ wynosily w tym przypadku odpowiednio 5000 i 1600 µg/ml. Nie stwierdzilam u tego gatunku fermentacji alkoholowej ani aktywacji cyklu glioksalanowego. Ponadto znacząco zmniejszył się udział difosforanu tiaminy w ogólnej puli pochodnych witaminy B₁. Zaobserwowałam także spadek zawartosci lipidów bez zmian proporcji w poszczególnych grupach kwasów tłuszczowych. Spośród przebadanych 66 środowiskowych szczepów *M. pachydermatis* tylko dla 15 wartość MIC była dwukrotnie wyższa w porównaniu ze szczepem referencyjnym. Stwierdziłam także addytywność działania oksytiaminy i ketokonazolu. Wzrost najbardziej opornych szczepów *M. pachydermatis* przy zastosowaniu kombinacji obu czynników całkowicie hamowały stężenia o 4 rzędy wielości mniejsze niż w przypadku każdej z tych substancji działającej osobno.

Bardziej odporne na działanie oksytiaminy były *S. cerevisiae* (MFC = 20000 µg/ml, GI₅₀ = 14600 µg/ml). Oksytiamina powodowała u nich aktywację dekarboksylazy pirogronianowej wywołaną wzrostem ekspresji genu kodującego to białko. Całkowita zawartość lipidów pozostała bez zmian, chociaż wzrosła zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, kosztem kwasów jednonienasyconych.

Najbardziej odporne na oksytiamine wśród drożdżaków była *C. albicans*, która charakteryzowała się GI₅₀ = 16000 µg/ml, a wartość MIC i MFC dla oksytiaminy przekraczała 40000 µg/ml. Na obecność oksytiaminy w pożywce reagowała wzrostem aktywności liazy izocytrynianowej oraz dehydrogenazy jabłczanowej, bez zmiany aktywności dekarboksylazy pirogronianowej. Tylko w tym przypadku udział difosforanu tiaminy w ogólnej puli pochodnych tiaminy obniżył się nieznacznie. Nie odnotowałam zmian

w całkowitej zawartości lipidów, chociaż wzrosła proporcja jednonienasyconych kwasów tłuszczowych kosztem kwasów nasyconych i wielonienasyconych.

Wśród modelu komórek nowotworowych najbardziej oporną na działanie oksytiaminy była linia MDA-MB-231 ($GI_{50} = 210 \mu\text{g/ml}$) w porównaniu z HeLa-C ($GI_{50} = 35 \mu\text{g/ml}$) i MCF-7 ($GI_{50} = 41 \mu\text{g/ml}$). Oksytiamina nie powodowała w komórkach MDA-MB-231 spadku aktywności dehydrogenazy jabłczanowej i mleczanowej. Wzrosła natomiast ogólna zawartość lipidów, a ich profil zmienił się na korzyść estrów cholesterolu i triacylogliceroli. Najbardziej wrażliwe komórki HeLa-C, jako jedyne zareagowały na oksytiaminę spadkiem aktywności zarówno dehydrogenazy mleczanowej jak i jabłczanowej oraz największym spadkiem udziału difosforanu tiaminy w ogólnej puli pochodnych witaminy B₁. Natomiast ogólna zawartość lipidów nie uległa zmianie.

Wyniki mojej pracy świadczą, że oksytiamina wykazuje własności cytotoksyczne w odniesieniu do obu badanych modeli. Jednak zdolność syntezy tiaminy i utrzymania wysokiej puli jej difosforanu znacznie zmniejsza wrażliwość komórek na działanie oksytiaminy. Większą oporność na działanie tej antywitaminy wykazują komórki zdolne do zachowania co najmniej niezmienionego poziomu syntezy lipidów, nawet jeśli zachwiane zostają proporcje pomiędzy poszczególnymi kwasami tłuszczowymi. Oporność komórek na oksytiaminę zależy także od cech metabolizmu. Znacznie bardziej wrażliwe są komórki preferujące metabolizm tlenowy i niezdolne do fermentacji, co jest szczególnie widoczne wśród poszczególnych gatunków w modelu komórek grzybowych. Podwyższona oporność na oksytiaminę u grzybów w porównaniu z komórkami nowotworowymi warunkowana jest także aktywacją cyklu glioksalanowego, omijającego hamowane oksytiaminą enzymy cyklu Krebsa.

Potencjał praktyczny oksytiaminy jako substancji o działaniu grzybobójczym potwierdza jej wpływ na środowiskowe szczepy *M. pachydermatis*. Szczególne nadzieje można wiązać z wykorzystaniem tej antywitaminy jako czynnika wspomagającego

dotychczas stosowane preparaty. Znajomość wyżej wspomnianych cech metabolicznych komórek może pozwolić na określenie ich podatności na działanie oksytiaminy i być podstawą do rozważenia jej farmakologicznego wykorzystania w zwalczaniu patogenów grzybowych lub nowotworów. Biorąc pod uwagę mechanizm działania oksytiaminy, jej wykorzystanie w zwalczaniu powierzchniowych zakażeń grzybami z rodzaju *Malassezia* wydaje się bezpieczniejsze i bardziej uzasadnione w porównaniu z walką z nowotworami. W tym ostatnim przypadku należy liczyć się z możliwością wystąpienia poważnych skutków ubocznych lub koniecznością opracowania metod ukierunkowanej terapii, gdzie ładunek oksytiaminy trafiałby do nowotworu z pominięciem prawidłowych komórek organizmu.

3. SUMMARY

Thiamine, one of the key molecules of the human and animals metabolism must be exogenously supplied with food. It is synthesized by the bacteria, plants and fungi. The best known derivative of thiamine is thiamine diphosphate which plays a role of coenzyme of mitochondrial pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenases as well as cytosolic transketolase. The function of the remaining thiamine phosphate derivatives remain unelucidated. It is postulated that some of them (i.e. adenosine triphosphate and thiamine triphosphate) may be involved in the response of cells to stress factors. Moreover, thiamine triphosphate may be a phosphate group donor for proteins phosphorylation.

Thiamine deficiency has serious negative consequences for both cells and organisms. In humans it leads to the locomotive dysfunction and metabolic or nervous system diseases. Therefore, any metabolic pathways with the participation of thiamine constitute potential targets for the pharmacological modification in the treatment against various biological pathogens. Such kind of modification can be achieved using antivitamin derivatives of the thiamine such as: oxythiamine, tetrahydrothiamine, tetrahydrooxythiamine, amprolium or thiochrome, which can interfere with metabolic processes dependent on vitamin B₁ because of their similarity to natural vitamin.

Previous studies have shown that oxythiamine has an inhibitory effect on growth of *Saccharomyces cerevisiae*, despite the fact that these cells are capable of thiamine synthesis. This fact has prompted me to looking for the answer, whether the inability of thiamine synthesis increases susceptibility to oxythiamine and to compare the induced effects and mechanisms of action of this antivitamin in two cellular models: model of synthesizing thiamine cells and model of cells unable to thiamine synthesis. The first one, representing the synthesizing thiamine fungi: *S. cerevisiae*, *Candida albicans* and *Malassezia pachydermatis*. The second model of unable to thiamine synthesis tumour cells was represented by three cell

lines: cervical cancer cell line HeLa–C and two breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. Such a choice allowed me to evaluate the cytotoxic potential of the investigated thiamine derivatives, as well as to study the metabolic determinants of cell response of both models depending on the thiamine synthesis capacity.

Preliminary experiments in a first model showed that only oxythiamine, significantly reduce the rate of cell growth. Therefore, I focused on its activity in the subsequent experiments. To evaluate the cytotoxicity of the oxythiamine in a model of fungal cells the standard tests (MIC and MCF values determination) and MTT assay in a model of tumour cells were used. In order to compare both models directly, GI₅₀ values were determined. Additionally, to determine antifungal potential of oxythiamine and ketoconazole the diffusion-cutters tests using environmental strains of the *M. pachydermatis* were carried out. The evaluation of the oxythiamine metabolic effects has been performed by the determination of activity of oxidative metabolism enzyme (malate dehydrogenase in both models), fermentation metabolism enzymes (lactate dehydrogenase, pyruvate decarboxylase - depending on the model) and the activity of glyoxalate cycle (citrate lyase in the fungal cell model). To assess the oxythiamine impact on the expression of genes encoding analysed enzymes, Real-Time PCR experiments were carried out. Changes in the relationship between thiamine and its phosphate derivative caused by oxythiamine in both models were determined by HPLC, while the changes in the level of lipid and their profiles were examined using the technique of thin layer chromatography and gas chromatography.

M. pachydermatis showed the highest sensitivity to oxythiamine in a model of fungal cells. MFC and GI₅₀ values were 5000 and 1600 µg/ml respectively. I did not find a alcoholic fermentation or activation of glyoxalate cycle in this species. In addition, the contribution of thiamine diphosphate in the total pool of vitamin B₁ and its derivatives were significantly reduced. I also observed a decrease in a total lipid content. However, the proportion between

each group of fatty acids remained unchanged. Only 10 of 66 tested environmental strains of *M. pachydermatis* have the oxythiamine MIC value two times higher in comparison to the reference strain. The sensitivity of other environmental strains was the same or even lower than reference strain. I found the additive action of oxythiamine and ketoconazole. The growth of the most resistant strains of *M. pachydermatis* was completely inhibited by the concentration of both substances four order of magnitude lower in the mixture than in the case were each of them acting alone.

S. cerevisiae were more resistant to oxythiamine (MFC = 20000 µg/ml, GI₅₀ = 14600 µg/ml). Oxythiamine induced the activation of pyruvate decarboxylase caused by increased expression of the gene encoding this protein. The total lipid content remained unchanged. Although, I observed the increased contribution of polyunsaturated fatty acids and the decreased contribution of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids.

C. albicans were the most resistant to oxythiamine among the model of fungal cells. In this case the GI₅₀ was equal 16000 µg/ml and the MIC and MFC values exceeded 40000 µg/ml. The presence of oxythiamine in the medium resulted in increase of isocitrate lyase and malate dehydrogenase activity, without altering the activity of pyruvate decarboxylase. *C. albicans* were the only cells where the contribution of thiamine diphosphate in the total pool of thiamine and its derivatives decreased slightly. I did not observed any changes in the total lipid content in this species. Although, I found the increased contribution of monounsaturated fatty acids and the decreased contribution of saturated and polyunsaturated fatty acids.

MDA-MB-231 cell line was the most resistant to oxythiamine in a model of tumour cells (GI₅₀ = 210 µg/ml) in comparison to the HeLa-C (GI₅₀ = 35 µg/ml) and MCF-7 cell lines (GI₅₀ = 41 µg/ml). The malate and lactate dehydrogenases activity in MDA-MB-231 was unchanged by oxythiamine. While the total lipid content increased and their profile has

changed in a favour of cholesterol esters and triglycerides. The most sensitive HeLa-C was the only cell line which responded to oxythiamine by decrease of both lactate and malate dehydrogenases activity. Moreover, I observed the largest decrease in the contribution of thiamine diphosphate in the total pool of thiamine and its derivatives in this cell line. In contrast, the total lipid content remain unchanged in this cells.

Results of this work indicate that oxythiamine exhibits cytotoxic properties for both tested models. However both, the ability of thiamine synthesis and high thiamine diphosphate content maintaining, significantly reduce the sensitivity of the cells to oxythiamine. Stronger resistance to the oxythiamie exhibit the cells capable to preserve the total lipids level even if the ratios between the fatty acids are changed. Cell resistance to oxythiamie also depends on the characteristics of metabolism. Much more sensitive cells prefer aerobic metabolism and are unable to conduct anaerobic fermentation, what is particularly evident among the different species in the model of fungal cells. Increased resistance to oxythiamine of fungi in comparison to cancer cells is also realized by the activation of glyoxalate cycle, which bypassing inhibited by oxythiamie enzymes of Krebs cycle.

Fungicidal potential of oxythiamine is confirmed by its impact on environmental strains of *M. pachydermatis*. It seems that oxythiamine can be successfully used especially as a supporting factor in commonly used methods of treatment. The understanding of the previously described metabolic properties may be useful in determination of cell sensitivity to oxythiamine and considering its pharmacological use in fungal pathogens or anti-tumours treatment. Due to the possibility of serious side effects, oxythiamine use against surface fungal infections caused by *Malassezia* seems to be safer and more reasonable than anti-cancer treatment. In this case, the development of directed therapy methods is needed, where the oxythiamine will be preferably transported into the tumour cells avoiding normal cells.