

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. prof. Mirosława Mossakowskiego  
Polskiej Akademii Nauk



**Poszukiwanie molekularnych mechanizmów autofagii  
indukowanej werapamilem w ludzkich komórkach  
nowotworowych linii COLO 205 i PC-3**

**mgr Elżbieta Kania**

Środowiskowe Laboratorium Mikroskopii Elektronowej  
Promotor: Prof. dr hab. Arkadiusz Orzechowski

Warszawa, 2015

Badania przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej były realizowane w Środowiskowym Laboratorium Mikroskopii Elektronowej IMDiK PAN w ramach projektów badawczych dofinansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz Narodowe Centrum Nauki:

Rola jonów wapniowych w pro-/anty-apoptotycznej aktywności klasteryny w komórkach nowotworowych na przykładzie komórek ludzkiego raka okrężnicy linii COLO 205 (NN 401 031 538).

Analiza porównawcza autofagii indukowanej w wybranych liniach komórek raka człowieka (Narodowe Centrum Nauki 2012/05/N/NZ7/00767).

Część Badań została zrealizowana w ramach współpracy naukowej z Zakładem Fizjologii i Patofizjologii Człowieka WUM a także w ramach stypendium EMBO (European Molecular Biology Organization) Short-Term Fellowship „Investigation of autophagy in verapamil-induced cell death” odbytego w laboratorium prof. Kevina Ryana w Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow, Wlk. Brytania.



Tematyka pracy oraz część wyników została zawarta w publikacjach:

Pająk B., Kania E., Gajkowska B., Orzechowski A. Verapamil-induced autophagy like process in colon adenocarcinoma COLO 205 cells; the ultrastructural studies (short communication), *Pharmacol. Rep.* (2012), 64: 991-996

Kania E., Pająk B., Orzechowski A. Calcium homeostasis and ER stress in control of autophagy in cancer cells. *Biomed Res Int* (2015), Article ID 352794, 12 pages, doi:10.1155/2015/352794

Serdeczne podziękowania za życzliwość, merytoryczne wsparcie oraz pomoc w realizacji zadań badawczych kieruję do:

Opiekuna naukowego oraz promotora pracy doktorskiej -  
prof. dr hab. Arkadiusza Orzechowskiego

a także dr hab. Beaty Pająk i prof. dr hab. Barbary Gajkowskiej

Pani Kierownik oraz Pracowników Środowiskowego Laboratorium Mikroskopii  
Elektronowej IMDiK PAN:

dr hab. Małgorzaty Frontczak-Baniewicz

Ryszarda Strzałkowskiego

Joanny Kruss

Grażyny Madejskiej

Kierownika oraz Pracowników Zakładu Fizjologii i Patofizjologii WUM:

prof. dr hab. Pawła Szulczyka

dr Ewy Nurowskiej

Kierownika oraz Pracowników Tumour Cell Death Laboratory, Beatson Institute for  
Cancer Research:

prof. Kevina Ryana

Jima O'Prey

Margaret O'Prey

Pracownika Zakładu Komórkowej Transdukcji Sygnału IMDiK:

dr hab. Grzegorza Czapskiego

Serdeczne podziękowania składam rodzinie i przyjaciołom.

## Streszczenie

### Wstęp

Autofagia jest podstawowym mechanizmem komórkowym, zachodzącym w każdej żywej komórce, polegającym na trawieniu fragmentów cytoplazmy lub całych organelli komórkowych, w celu pozyskania endogennego źródła energii. W wielu przypadkach autofagia jest indukowana w komórkach nowotworowych ponad poziom podstawowy pod wpływem działania czynników stresowych np. leków przeciwnowotworowych. Wywołana wówczas autofagia ma przede wszystkim charakter mechanizmu obronnego, niedopuszczającego do indukcji apoptozy, jednak zintensyfikowana autofagia może także prowadzić do programowanej śmierci komórki.

Werapamil - inhibitor kanałów wapniowych typu L, stosowany dotychczas jako lek w farmakoterapii chorób sercowo-naczyniowych, wykazuje również działanie cytotoksyczne w stosunku do wybranych grup nowotworów. Oprócz podstawowej funkcji w regulacji stężenia wolnych jonów  $Ca^{2+}$  w cytozolu, werapamil znany jest także z blokowania dokomórkowego transportu glukozy. Zarówno zaburzenia gospodarki wapniowej, jak i ograniczanie dostępności glukozy, mogą prowadzić do wywołania stresu siateczki śródplazmatycznej, a to z kolei może indukować autofagię. Werapamil został niedawno scharakteryzowany, jako substancja modulująca proces autofagii. Dokładny mechanizm jego oddziaływania na proces autofagii nie został jednak do tej pory poznany.

### Cel pracy

Celem niniejszej pracy było zweryfikowanie hipotezy o nowej funkcji werapamilu jako modulatora autofagii a także ustalenie molekularnego mechanizmu indukowanej werapamilem autofagii. Weryfikacji zostały poddane trzy możliwe tory oddziaływania werapamilu: a) hamowanie napływu jonów  $Ca^{2+}$  do komórki przez blokowanie kanałów wapniowych typu L; b) upośledzanie dokomórkowego transportu glukozy; c) indukcja stresu siateczki śródplazmatycznej. Ponadto celem przeprowadzonych badań było również ustalenie roli indukowanej werapamilem autofagii w programowanej śmierci komórki.

### Materiały i metody

Badania w ramach niniejszej dysertacji zostały przeprowadzone *in vitro* na ludzkich modelach komórkowych gruczolaka okrężnicy (linia COLO 205), raka

## STRESZCZENIE

stercza (linia PC-3) oraz normalnych, nabłonkowych komórkach stercza (linia PNT-2), pełniących rolę linii referencyjnej. Doświadczenia opracowano w oparciu o kanon metod wykorzystywanych w badaniach autofagii i apoptozy w hodowlach komórkowych, na poziomie zarówno komórkowym jak i molekularnym. W ramach doświadczeń wykonano pomiary przeżywalności (test MTT) i proliferacji (test z fioletem krystalicznym) komórek pod wpływem werapamilu oraz innych inhibitorów metabolicznych. Wykonano także pomiar stężenia wewnątrzkomórkowej puli jonów  $Ca^{2+}$ , po zastosowaniu inhibitorów kanałów wapniowych typu L, na podstawie fluorescencji FURA-2-AM. Korzystając z cytometru przepływowego, na podstawie pomiaru frakcji komórek zawierających pofragmentowane DNA (pik subG<sub>1</sub> na histogramie) oceniono natężenie programowanej śmierci komórki indukowanej pod wpływem modulatorów autofagii i apoptozy. Wykonano analizę Western blot ukierunkowaną na białka istotne dla procesu autofagii, apoptozy a także indukcji stresu siateczki śródplazmatycznej. Mikroskop konfokalny wykorzystano do wykonania obserwacji autofagosomów a transmisyjny mikroskop elektronowy do analizy ultrastruktury komórek pod kątem obecności struktur typowych dla autofagii. Podjęto także próbę charakterystyki kanałów wapniowych w błonie komórek COLO 205 i PC-3 z wykorzystaniem techniki patch-clamp.

### *Wyniki*

Werapamil obniżył przeżywalność oraz proliferację komórek nowotworowych linii COLO 205 i PC-3, podczas gdy cytotoksyczne działanie werapamilu na prawidłowe komórki linii PNT-2 było słabsze. Dodatkowo, pod wpływem inkubacji z werapamilem, w komórkach COLO 205 i PC-3 oraz w znacznie mniejszym stopniu w komórkach PNT-2, widoczne było nagromadzenie wczesnych i późnych wakuol autofagowych oraz wzmożona ekspresja białka MAP LC-II związanego z błoną autofagosomów. W komórkach COLO 205 i PC-3 poddanych działaniu werapamilu, nie zaobserwowano natomiast zmian w ekspresji innych białek markerowych dla autofagii tj. Bekliny1, Vps34 czy Bcl-2. Pod wpływem werapamilu, redukcji uległo natomiast stężenie wolnych jonów  $Ca^{2+}$  w cytoplazmie komórek COLO 205 oraz PC-3, co nie miało miejsca w przypadku komórek linii PNT-2. Ponadto wpływ bardziej specyficznego niż werapamil inhibitora kanałów wapniowych typu L - nifedypiny na przeżywalność, proliferację oraz stężenie jonów  $Ca^{2+}$  w cytoplazmie badanych komórek był ograniczony. Analiza obecności wapniowych kanałów błonowych w komórkach COLO 205 i PC-3 metodą patch-clamp nie wykazała indukcji napięciowo-zależnych prądów wapniowych, charakterystycznych dla

## STRESZCZENIE

kanałów typu L czy T. Wykazano natomiast, iż w badanych komórkach aktywowane są napięciowo-niezależne kanały, które są modulowane przez dostępność jonów  $\text{Ca}^{2+}$  a także obecność lantanu i werapamilu. Doświadczenia przeprowadzone z wykorzystaniem werapamilu oraz wzrastających stężeń glukozy (1, 2, 4 g/l) wykazały, iż cytotoksyczne działanie werapamilu na komórki COLO 205 i PC-3 może być kompensowane wyższym od 1 g/l stężeniem glukozy w pożywce. Ocena cytotoksyczności floretyny – inhibitora transporterów glukozy SGLT1, SGLT2 i GLUT2 wykazała natomiast, iż floretyna zastosowana indywidualnie nie wpływa na przeżywalność komórek COLO 205 i PC-3, jednak użyta wraz z werapamilem, potęguje jego cytotoksyczność. Wykazano ponadto, iż w komórkach COLO 205 i PC-3 ekspresjonowany jest inny transporter glukozy – GLUT1, którego poziom nie zmienia się jednak pod wpływem werapamilu. Werapamil stymulował ekspresję białek markerowych dla stresu siateczki śródplazmatycznej – GRP78/BiP i CHOP, która nie była widoczna (z wyjątkiem białka CHOP w komórkach PC-3) przy jednoczesnym podwyższeniu stężenia glukozy w pożywce. Co więcej, w obrazie ultrastruktury komórek COLO 205 i PC-3 poddanych działaniu werapamilu, widoczne były zmiany patologiczne w obrębie siateczki śródplazmatycznej. Z kolei doświadczenie z jednoczesnym wykorzystaniem induktora autofagii – werapamilu oraz inhibitora autofagii – chlorochiny w komórkach COLO 205, ujawniło nasilenie ekspresji aktywnej kaspazy 3 oraz nieaktywnej formy PARP, a także zwiększyło pulę komórek posiadających pofragmentowane DNA (frakcja  $\text{subG}_1$  na histogramie). Dodatkowo, programowana śmierć komórki wywołana w komórkach COLO 205 przez werapamil w niższym z zastosowanych stężeń (100  $\mu\text{M}$ ) z użytą równocześnie chlorochiną była hamowana po zastosowaniu inhibitora kaspaz – Z-VAD.

### Wnioski

W komórkach nowotworowych linii COLO 205, PC-3 a także w mniejszym stopniu w prawidłowych komórkach linii PNT-2, zastosowanie werapamilu spowodowało zależną od stężenia i czasu działania indukcję autofagii. Przeprowadzone badania wykazały, iż przyczyną wywołania autofagii w komórkach nowotworowych może być obniżenie wewnątrzkomórkowej puli jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Niewykluczone jednak, iż werapamil reguluje dostępność jonów  $\text{Ca}^{2+}$  na drodze blokowania innych niż napięciowo-zależne kanałów wapniowych. Z uwagi na fakt, iż działanie werapamilu nie jest wysoce specyficzne, a zastosowane w eksperymentach wyższe stężenia glukozy hamowały jego cytotoksyczność, wielce prawdopodobne jest, iż to właśnie ograniczenie dokomórkowego

## STRESZCZENIE

transportu glukozy jest przyczyną indukowanej werapamilem autofagii. Ponadto wiadomo, iż w tym przypadku werapamil oddziałuje na transporter glukozy inny niż SGLT1, SGLT2 czy GLUT2. Szczegółowy molekularny mechanizm wywołanej werapamilem autofagii obejmuje aktywację białka MAP LC3-II, kluczowego w procesie formowania autofagosomów, a także indukcję stresu siateczki śródplazmatycznej objawiającą się wzmożoną ekspresją białek GRP78/BiP i CHOP. Werapamil wywołał także programowaną śmierć komórki w komórkach COLO 205. Zablockowanie procesu autofagii wzmocniło jednak cytotoksyczne działanie werapamilu w komórkach i potęgowało indukcję apoptozy.



**Abstract**Introduction

Autophagy is a basic cellular mechanism existing in all living cells, enabling digestion of cytoplasmic fragments or cellular organelles to deliver an intracellular source of energy. Autophagy is often up-regulated upon the basal level in cancer cells due to response to numerous stress conditions including anticancer drugs. In such situation autophagy serve primarily as a cytoprotective mechanism, facilitating cells to escape apoptosis induction, however, an extensive autophagy may contribute to programmed cell death.

Verapamil, a well known L-type calcium channel inhibitor, is frequently used in cardiac disease treatment, however, its cytotoxic effect on various cancers was also reported. Besides the main function in the regulation of free cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  ions, verapamil is able to block glucose uptake to the cells. Both, disturbance in calcium homeostasis and limited glucose availability may lead to endoplasmic reticulum stress induction, which in turn may cause autophagy. Verapamil was recently characterized as an autophagy modulator, however, the exact mechanism of its action was not scrutinized.

Aim of the study

The aim of this study was to verify the hypothesis of a novel role of verapamil as an autophagy modulator and to delineate a molecular mechanism of verapamil-induced autophagy. The three possible pathways of verapamil action have been investigated: a) inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  flux to the cell due to blockage of L-type calcium channel; b) retarded glucose transport into the cell; c) induction of endoplasmic reticulum stress. Moreover, another aim of the studies was to interrogate the role of verapamil-induced autophagy in a programmed cell death.

Materials and methods

The following dissertation presents *in vitro* studies on human cell line models of colon adenocarcinoma (COLO 205), prostate cancer (PC-3) and normal epithelial, prostate cells (PNT-2), as a reference line. Experiments were planned in accordance with the standard cellular and molecular methods on cell cultures, used commonly in autophagy and apoptosis studies. Within the project cellular viability (MTT assay) and proliferation (Crystal Violet assay) upon the treatment with verapamil and several metabolic inhibitors

## ABSTRACT

were assessed. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  measurement based on FURA-2-AM fluorescence was also investigated after administration of L-type calcium channel inhibitors. Programmed cell death was investigated by the measurement of cells with low DNA content (subG<sub>1</sub> peak in histogram) in flow cytometry upon the treatment with autophagy and apoptosis modulators. Western blot analysis was performed to evaluate the expression of autophagy, apoptosis and endoplasmic reticulum stress related proteins. Furthermore, the observations of autophagosomes accumulation in confocal microscopy as well as typical autophagy structures present in electron microscopy images, were performed. Patch-clamp technique was also applied to investigate the activity of calcium channels in COLO 205 and PC-3 plasma cell membranes.

### *Results*

Verapamil significantly decreased cell viability and proliferation of COLO 205 and PC-3 cells, while the cytotoxic effect on PNT-2 cells was less evident. Furthermore, upon verapamil treatment, the accumulation of early and late autophagic vacuoles in COLO 205, PC-3 and moderately in PNT-2 were noticed, along with enhanced expression of MAP LC3-II – autophagosome-membrane protein marker. The expression of other autophagy related proteins such as Beclin1, Vps34 and Bcl-2 did not change in verapamil-treated COLO 205 and PC-3 cells. In contrast, the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration was decreased after verapamil administration in COLO 205 and PC-3, but not in PNT-2 cells. In addition, incubation of cells with specific L-type calcium channel inhibitor – nifedipine has little impact on cell viability, proliferation and cytoplasmic calcium concentration. Patch-clamp analysis of the activity of membrane calcium channels in COLO 205 and PC-3 cells did not provide evidence for the L- or T-type voltage dependent calcium channels activation in cell lines tested. It was shown however, that COLO 205 and PC-3 cells exhibit voltage-independent currents, which can be modulated by  $\text{Ca}^{2+}$ , lanthanum and verapamil presence. Experiments performed with verapamil and increased concentration of glucose (1, 2, 4 g/l) revealed that the cytotoxic effect of verapamil in COLO 205 and PC-3 cells could be abolished by the higher than 1 g/l glucose concentration in medium. In turn, phloretin, the SGLT1, SGLT2 and GLUT2 glucose transporters inhibitor, did not appear to be cytotoxic to COLO 205 and PC-3 cells by itself, but when combined with verapamil, phloretin increased cytotoxicity of verapamil. Another glucose transporter namely GLUT1 was shown to be expressed in COLO 205 and PC-3 cells, however the level of GLUT1 did not change upon verapamil treatment. Verapamil

## ABSTRACT

up-regulated the expression of proteins known as hallmarks of endoplasmic reticulum stress - GRP78/BiP and CHOP. Moreover, aforementioned verapamil-dependent rise in expression was not visible (apart from CHOP protein in PC-3 cells) when glucose concentration in media was increased. Importantly, the endoplasmic reticulum structure of verapamil-treated COLO 205 and PC-3 cells observed in transmission electron microscopy, was deeply affected. Next, simultaneously used autophagy inductor – verapamil and autophagy inhibitor – chloroquine, enhanced expression of an active caspase 3 and inactive PARP. Increased number of cells with less DNA content (subG<sub>1</sub> peak in histogram) in COLO 205 cells was also observed. Moreover, programmed cell death evoked by verapamil (100 µM) and chloroquine in COLO 205 cells was inhibited by administration of caspase inhibitor – Z-VAD.

### Conclusions

Verapamil dose and time-dependently stimulated autophagy in colon adenocarcinoma COLO 205 cells, prostate cancer PC-3 cells and also, with lower efficacy, in normal prostate PNT-2 cell line. Performed experiments showed that verapamil-induced autophagy might result from low intracellular calcium concentration. Conceivably, verapamil affects the cytoplasmic calcium by regulating other than voltage-dependent calcium channels. Bearing in mind, that verapamil is nonspecific L-type channel inhibitor and that higher than 1g/l glucose concentrations used in experiments were able to overcome verapamil cytotoxicity, it is very likely that verapamil induced autophagy through retarded glucose uptake by the cells. It is also known, that in the latter case, verapamil acts through different than SGLT1, SGLT2 or GLUT2 glucose transporter. The detailed molecular mechanism of autophagy induction by verapamil include the upregulation of MAP LC3-II – the key protein involved in autophagosome formation as well as activation of endoplasmic reticulum stress substantiated by enhanced expression of GRP78/BiP and CHOP proteins. Verapamil also induced programmed cell death in COLO 205 cells. Interestingly, an inhibition of autophagy in COLO 205 led to higher verapamil cytotoxicity and even accelerated apoptosis.

**Spis treści**

Streszczenie .....	5
Abstract .....	9
1. Wykaz skrótów .....	15
2. Wstęp.....	18
2.1 Autofagia .....	18
2.2 Rola autofagii w komórkach nowotworowych .....	19
2.3 Molekularne mechanizmy prowadzące do indukcji autofagii w komórkach nowotworowych .....	24
2.4 Zaangażowanie jonów $Ca^{2+}$ w regulację autofagii w komórkach nowotworowych .....	25
2.5 Rola metabolizmu glukozy w indukcji autofagii w komórkach nowotworowych .....	29
2.6 Autofagia indukowana w komórkach nowotworowych za pośrednictwem stresu siateczki śródplazmatycznej .....	32
2.7 Rola białek opiekuńczych siateczki śródplazmatycznej w regulacji autofagii.....	36
2.8 Wpływ werapamilu na indukcję autofagii .....	39
3. Cel pracy.....	41
4. Materiały i metody .....	42
4.1 Linie komórkowe wykorzystane w doświadczeniach.....	42
4.2 Sprzęt do hodowli, plastiki laboratoryjne .....	43
4.3 Metody pracy z hodowlą komórkową (mrożenie i odzyskiwanie komórek, przygotowanie komórek do doświadczeń).....	44
4.4 Doświadczenia wykonane na hodowlach komórkowych w płytkach wielodołkowych – testy metaboliczne .....	44
4.5 Pomiar natężenia programowanej śmierci komórki w cytometrze przepływowym na podstawie odsetka komórek zawierających frakcję „subG <sub>1</sub> ” DNA.....	48

## SPIS TREŚCI

4.6	Pomiar względnego poziomu białek – Western blot.....	48
4.7	Badania przeprowadzone w mikroskopie konfokalnym.....	52
4.8	Analiza ultrastruktury w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM).....	53
4.9	Analiza obecności kanałów wapniowych – PATCH-CLAMP.....	53
4.10	Analiza statystyczna.....	56
5.	Wyniki.....	57
5.1	Wpływ werapamilu na przeżywalność i proliferację komórek COLO 205, PC-3 oraz PNT-2.....	57
5.2	Zmiany w obrazie ultrastrukturalnym komórek COLO 205, PC-3 i PNT-2 pod wpływem działania werapamilu.....	61
5.3	Wpływ werapamilu na autofagię.....	71
5.4	Wpływ nifedypiny – swoistego inhibitora kanałów wapniowych typu L na przeżywalność oraz proliferację komórek COLO 205, PC-3 i PNT-2.....	76
5.5	Wpływ inhibitorów kanałów wapniowych typu L na wewnątrzkomórkową pulę jonów $Ca^{2+}$ w komórkach COLO 205, PC-3 i PNT-2.....	80
5.6	Analiza aktywności przepuszczalnych dla $Ca^{2+}$ kanałów błonowych w komórkach COLO 205 i PC-3.....	82
5.7	Wpływ podwyższonego stężenia glukozy w pożywce na cytotoksyczne skutki działania werapamilu w komórkach COLO 205 i PC-3.....	87
5.8	Próba ustalenia, który z transporterów glukozy może być zaangażowany w zależne od werapamilu blokownie dostępu glukozy komórkom nowotworowym.....	89
5.9	Wpływ werapamilu na białka zaangażowane w regulację stresu siateczki śródplazmatycznej.....	90
5.10	Wpływ inhibitora autofagii – chlorochiny na cytotoksyczne działanie werapamilu w komórkach COLO 205.....	93
6.	Podsumowanie wyników.....	97

## SPIS TREŚCI

7.	Dyskusja .....	99
8.	Wnioski .....	111
9.	Perspektywy .....	112
10.	Spis rycin .....	113
11.	Piśmiennictwo .....	117

## WYKAZ SKRÓTÓW

### 1. Wykaz skrótów

<b>2-DG</b>	2-deoksyglukoza; ang. 2-deoxy-D-glucose
<b>3-MA</b>	3-metyloadenina; ang. 3-methyladenine
<b>Ambra1</b>	Białko aktywujące w autofagii regulowanej przez Beklinę 1; ang. Activating molecule in Beclin 1 regulated-autophagy
<b>AMPK</b>	Kinaza białkowa aktywowana przez AMP; ang. AMP-activated protein kinase
<b>ATF4</b>	Czynnik transkrypcyjny ATF4; ang. Activating transcription factor 4
<b>ATF6</b>	Czynnik transkrypcyjny ATF6; ang. Activating transcription factor 6
<b>Atg</b>	Geny związane z autofagią; ang. Autophagy-related genes
<b>ATP2C1</b>	ATPaza transportująca wapń; ang. Calcium-transporting ATPase type 2C member 1
<b>ACD</b>	Śmierć komórki zależna od autofagii; ang. Autophagic cell death
<b>Bax</b>	Białko X związane z Bcl-2; ang. Bcl-2-associated X protein
<b>Bcl-2</b>	Chłoniak/białaczka B-komórkowa-2 – białko antyapoptotyczne; ang. B-cell lymphoma 2
<b>Bif1</b>	Czynnik oddziałujący z BAX; ang. B1/BAX-interacting factor 1
<b>CaMKK<math>\beta</math></b>	$\beta$ kinaza kinazy zależnej od Ca <sup>2+</sup> /kalmoduliny; ang. Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent kinase kinase $\beta$
<b>CAV1</b>	Kaweolina 1; ang. Caveolin 1
<b>cFLIP</b>	Komórkowe białko hamujące podobne do FLICE; ang. Cellular FLICE-like inhibitory protein
<b>CHOP</b>	Białko homologiczne C/EBP; ang. C/EBP-homologous protein
<b>CLU</b>	Klasteryna; ang. Clusterin
<b>CRAC</b>	Kanał Ca <sup>2+</sup> aktywowany przez uwalnianie Ca <sup>2+</sup> ; ang. Ca <sup>2+</sup> release-activated Ca <sup>2+</sup> channel
<b>DAPK</b>	Kinaza białkowa związana ze śmiercią; ang. Death-associated protein kinase
<b>DRAM-1</b>	Regulowany zniszczeniem modulator autofagii-1; ang. Damage regulated autophagy modulator-1
<b>eIF2<math>\alpha</math></b>	Eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 2 $\alpha$ ; ang. Eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$
<b>ER</b>	Siateczka śródplazmatyczna; ang. Endoplasmic reticulum
<b>ERAD</b>	Degradacja związana z siateczką śródplazmatyczną; ang. ER-associated protein degradation
<b>ERK1/2</b>	Kinaza 1/2 regulowana przez sygnały zewnątrzkomórkowe; ang. Extracellular signal-regulated kinase 1/2
<b>GLUT</b>	Transporter glukozy; ang. Glucose transporter

## WYKAZ SKRÓTÓW

<b>GRP78/BiP</b>	Białko 78 kDa regulowane glukozą; ang. 78 kDa glucose-regulated protein
<b>HER2</b>	Ludzki receptor 2 epidermalnego czynnika wzrostu; ang. Human epidermal growth factor receptor 2
<b>HIPK2</b>	Oddziałująca z homeodomeną kinaza białkowa typu 2; ang. Homeodomain-interacting protein kinase 2
<b>IP3</b>	Trifosforan inozytolu; ang. Inositol triphosphate
<b>IP3-R</b>	Receptor trifosforanu inozytolu; ang. Inositol triphosphate receptor
<b>IRE1</b>	Enzym zależny od inozytolu; ang. Inositol-requiring enzyme 1
<b>JNK</b>	Kinaza białkowa fosforylująca N-koniec białka Jun; ang. c-Jun NH2-terminal kinase
<b>MAP LC3</b>	Lekki łańcuch 3 białka związanego z mikrotubulami; ang. Microtubule-associated protein light chain 3
<b>MCU</b>	Mitochondrialny uniporter wapniowy; ang. Mitochondrial calcium uniporter
<b>MEK1/2</b>	Kinaza kinazy aktywowanej przez mitogen 1/2, ang. Mitogen-activated protein kinase kinase 1/2
<b>MPTP</b>	Mitochondrialny por przejściowej przepuszczalności (Megakanał); ang. Mitochondrial permeability transition pore
<b>mTOR</b>	Ssacze białko docelowe dla rapamycyny; ang. Mammalian target of rapamycin
<b>mTORC1</b>	Kompleks 1 mTOR; ang. Mammalian target of rapamycin complex 1
<b>NCX</b>	Wymiennik (antyporter) $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ; ang. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiport
<b>PARP</b>	Polimeraza ADP-rybozy; ang. Poly (ADP-ribose) polymerase
<b>PDI</b>	Disulfidoizomeraza białek; ang. Protein disulfide isomerase
<b>PERK</b>	Zależna od RNA kinaza białkowa siateczki śródplazmatycznej ang. RNA-dependent protein ER kinase
<b>PI3-K</b>	3-kinaza fosfatydyloinozytolu; ang. Phosphoinositide 3-kinase
<b>PCD</b>	Programowana śmierć komórki; Programmed cell death
<b>PMCA</b>	ATPaza wapniowa błony komórkowej; ang. Plasma membrane calcium ATPase
<b>PUMA</b>	Regulowany przez p53 modulator apoptozy; ang. p53 up-regulated modulator of apoptosis
<b>Raf-1</b>	Serynowo-treoninowa kinaza białkowa; ang. Proto-oncogene serine/threonine protein kinase
<b>RyR</b>	Receptor rianodynowy; ang. Ryanodine receptor
<b>SERCA</b>	ATPaza wapniowa siateczki śródplazmatycznej; ang. Sarco/endoplasmic reticular calcium ATPase



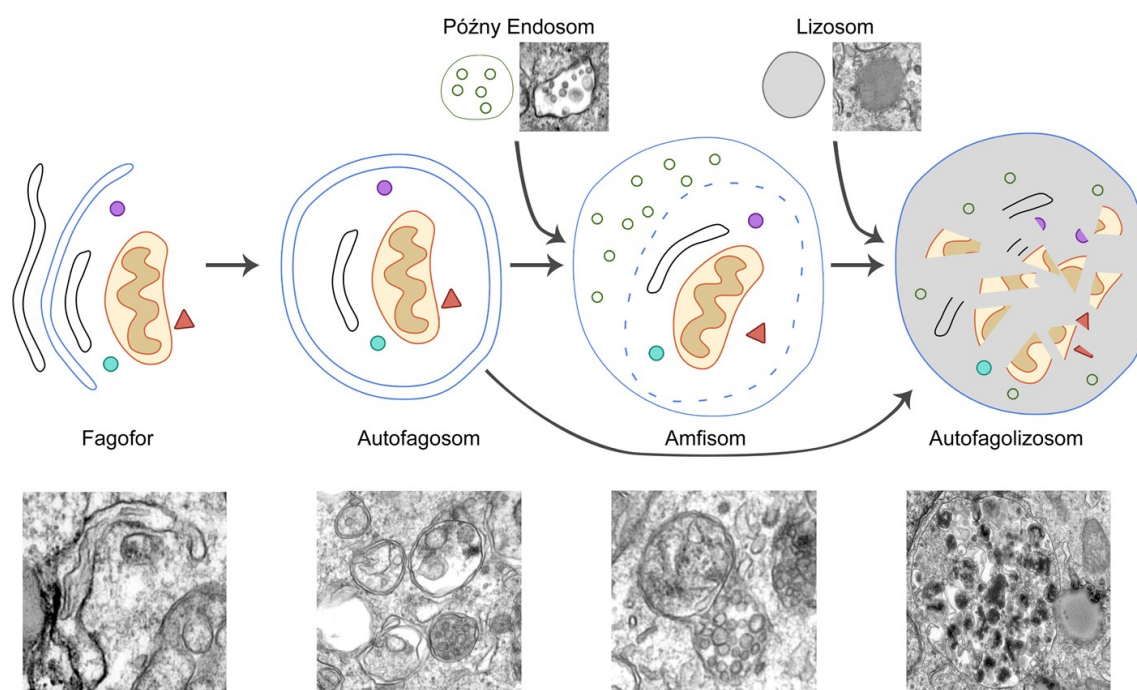
## WYKAZ SKRÓTÓW

<b>SGLT</b>	Zależny od Na <sup>+</sup> kotransporter glukozy; ang. Na <sup>+</sup> -dependent glucose cotransporter
<b>SOCE</b>	Kanały wapniowe aktywowane pojemnościowo; ang. Store-operated calcium channel entry
<b>TFEB</b>	Czynnik transkrypcyjny EB; ang. Transcription factor EB
<b>TNBC</b>	Potrójnie negatywny rak piersi; ang. Triple-negative breast cancer
<b>TRAIL</b>	Ligand czynnika martwicy nowotworu indukujący apoptozę; ang. Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
<b>TRP</b>	Kanały z grupy receptorów przejściowego potencjału; ang. Transient receptor potential channels
<b>UPR</b>	Reakcja odpowiedzi na nagromadzenie nieufornowanych lub źle uformowanych białek w ER; ang. Unfolded protein response
<b>UVRAG</b>	Produkt genu związanego z opornością na promieniowanie ultrafioletowe; ang. Ultraviolet irradiation resistance-associated gene product
<b>VDAC</b>	Napięciowo-zależne kanały anionowe; ang. Voltage-dependent anion channel
<b>Vps34</b>	Podjednostka katalityczna kinazy fosfatidyloinozytolu klasy III; ang. Phosphatidylinositol 3-Kinase Catalytic Subunit Type 3
<b>V<sub>r</sub></b>	Potencjał odwrócenia; ang. Reversal Potential
<b>XBP-1</b>	Białko 1 wiążące kasetę X; ang. X-box binding protein 1

## 2. Wstęp

### 2.1 Autofagia

Autofagia jest mechanizmem degradacyjnym, który w formie konstytutywnej (*basal autophagy*) funkcjonuje powszechnie w każdej żywej komórce. Rolą autofagii jest pozyskiwanie endogennych źródeł energii, na drodze trawienia fragmentów cytoplazmy, białek czy organelli komórkowych za pośrednictwem lizosomalnego systemu degradacyjnego (Todde i wsp., 2009). Poprzez zintensyfikowanie procesu autofagii komórka może przetrwać w sytuacji braku dostarczanych z zewnątrz substancji odżywczych, utrzymując swój metabolizm na poziomie podstawowym. Autofagia nasila się również w odpowiedzi na działanie różnorodnych czynników wywołujących stres komórkowy, tj. infekcji patogenem, hipoksji, nadmiaru reaktywnych form tlenu a także działania leków przeciwnowotworowych (Gozuacik i Kimchi, 2004). Istnieją trzy rodzaje autofagii różniące się między sobą sposobem dostarczania do błony lizosomów składników komórkowych przeznaczonych do degradacji. Wyróżnia się mikroautofagię (*microautophagy*), w której materiał komórkowy jest dostarczany bezpośrednio do lizosomów poprzez wpuklenie ich błony (endocytoza), autofagię za pośrednictwem białek opiekuńczych (*chaperone-mediated autophagy*) oraz najbardziej powszechną – makroautofagię (*macroautophagy*) (Todde i wsp., 2009). Makroautofagię (opisywaną dalej w pracy jako „autofagia”) charakteryzuje unikalny mechanizm degradacji, który rozpoczyna się od wyodrębnienia fragmentu aparatu Golgiego lub siateczki śródplazmatycznej tworzącego tzw. fagofor (Ryc. 1). Fagofor, przyjmujący kształt półksiężyca otacza wybrany fragment cytoplazmy lub organella komórkowe przeznaczone do degradacji. W dalszej kolejności końcowe części fagoforu łączą się i zamykają wewnętrzną przestrzeń, w której uwięzione zostają organella komórkowe, formując autofagosom nazywany również wczesną wakuolą autofagową o podwójnej błonie. Następnie autofagosom ulega fuzji z późnym endosomem lub bezpośrednio z lizosomem tworząc odpowiednio amfisol lub autofagolizosom. Amfisol jest formą pośrednią, która ostatecznie również łączy się z lizosomem tworząc autofagolizosom, który stanowi późną wakuolę autofagową, w obrębie której zachodzi trawienie materiału komórkowego z udziałem hydrolaz lizosomalnych. Podczas przekształcania autofagosomu w autofagolizosom zanika również wewnętrzna błona autofagosomu (Nixon, 2013).



Ryc. 1

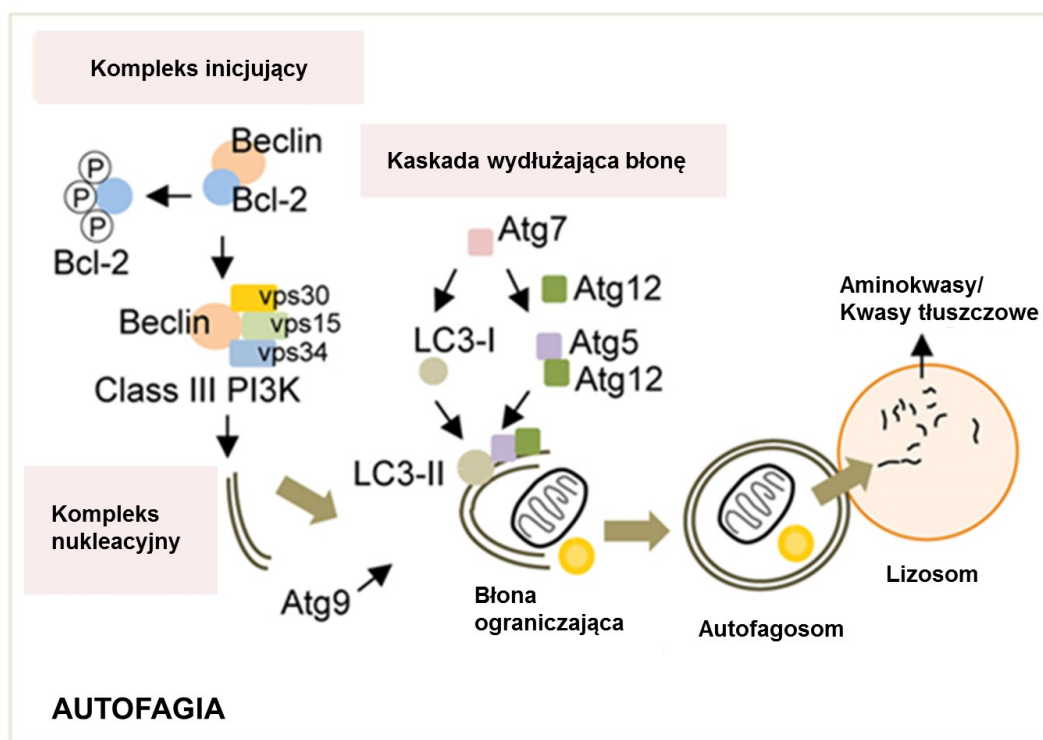
Schematyczne przedstawienie poszczególnych etapów autofagii, zilustrowane zdjęciami wykonanymi w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM).

Formowanie błony autofagosomu jest warunkowane aktywnością kompleksów białkowych niezbędnych dla procesu autofagii. Kompleks białkowy składający się z Beclin 1 (Atg 6), która łączy się z Vps34 i Vps15 (odpowiednio podjednostki katalityczna i regulatorowa kinazy fosfatydyloinozytolu klasy III – PI3-K) a także białkami UVRAG, Bif1, Ambra1 umożliwia zaokrąglenie fagoforu oraz następczą rekrutację białek z rodziny Atg (*autophagy related genes*), m.in. Atg 5, Atg 7, Atg 12 odpowiedzialnych za nukleację i wydłużanie fagoforu (Vicencio i wsp., 2009). Dalsze wydłużanie fagoforu jest zależne od przekształcenia białka MAP LC3 (*microtubule-associated protein light chain 3*) z formy cytozolowej (MAP LC3-I) do formy lipidowej związanej z wewnętrzną błoną autofagosomu (MAP LC3-II) (Nixon, 2013). Schematyczna ilustracja udziału białek komórkowych w procesie autofagii jest przedstawiona na Rycinie 2.

## 2.2 Rola autofagii w komórkach nowotworowych

Podstawową rolą autofagii w komórkach jest zapewnienie szeroko pojętej homeostazy poprzez usuwanie zagregowanych białek lub uszkodzonych organelli komórkowych a także podtrzymanie metabolizmu komórki w sytuacji braku zewnętrznych

źródeł energii. Choć rola autofagii w komórkach nietransformowanych jest dobrze poznana, jej funkcja w komórkach nowotworowych wciąż pozostaje przedmiotem badań.



Ryc. 2

Molekularny mechanizm formowania struktury autofagosomu podczas autofagii (schemat na podstawie Singh, 2011).

Wydaje się, iż autofagia jest zależna od wielu czynników, m.in. od rodzaju i stadium zaawansowania nowotworu czy mutacji genów występujących w danym nowotworze. Dotychczas udowodniono, iż w niektórych typach nowotworów jak np. w nowotworze trzustki z konstytutywną aktywacją kinazy Ras, proces autofagii ulega nasileniu, co umożliwia komórkom nowotworowym przyspieszony wzrost i zwiększa ich przeżywalność (Macintosh i Ryan, 2013). Inaczej natomiast jest w przypadku nowotworów piersi, jajników czy stercza z mutacją w pojedynczej kopii genu kodującego Beclinę 1, gdzie z kolei upośledzenie procesu autofagii ułatwia rozwój nowotworu (Lozy i Karantza, 2012). Autofagia w komórkach nowotworowych może zatem stanowić mechanizm hamowania progresji nowotworowej, może jednak również odgrywać rolę onkogeną poprzez umożliwianie komórkom nowotworowym wzrostu i przetrwania w niekorzystnych warunkach mikrośrodowiska.

### 2.2.1 Rola autofagii w hamowaniu nowotworzenia

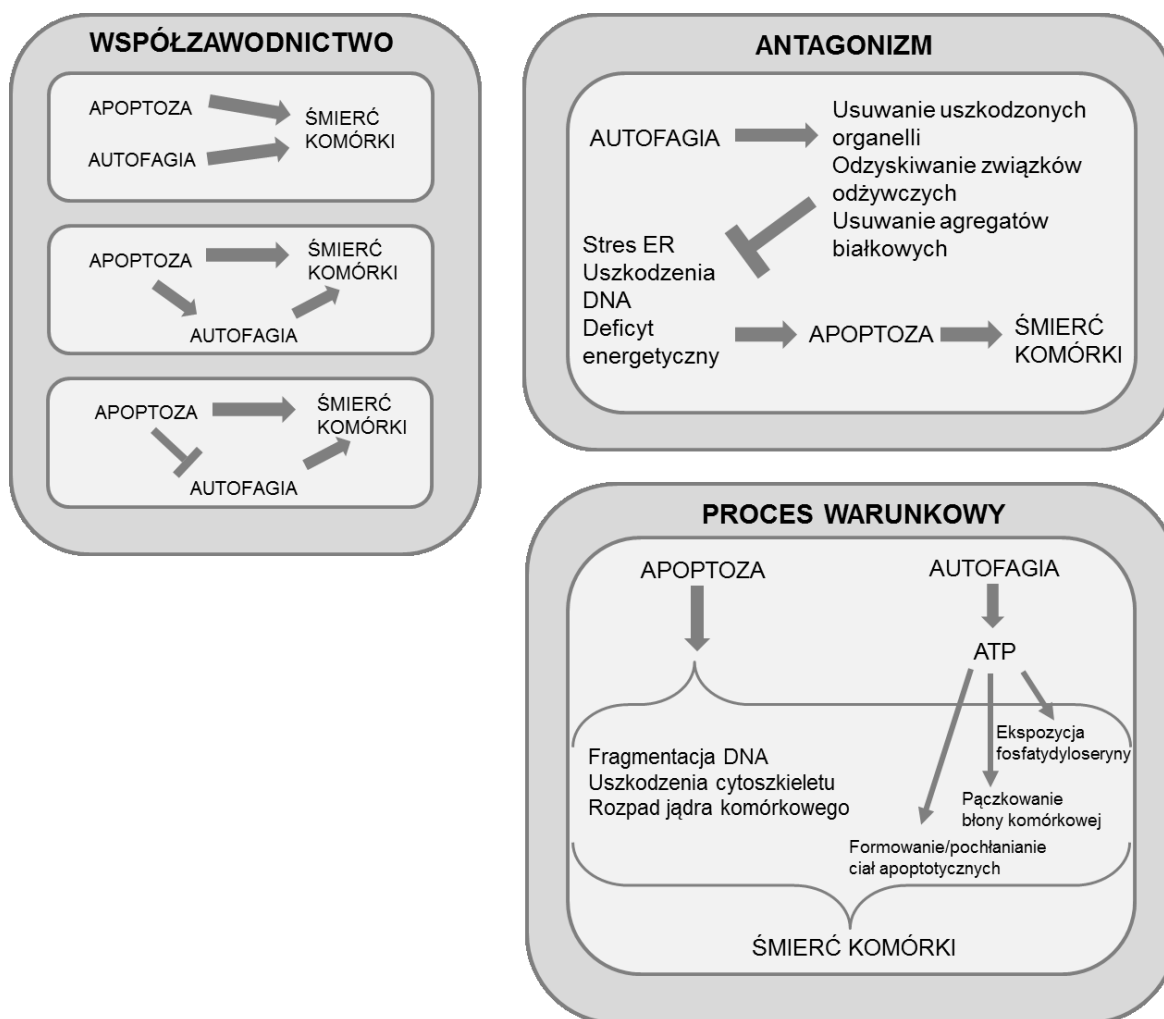
Ochronna rola autofagii (Ryc. 3), polegająca na hamowaniu transformacji komórkowej, przejawia się głównie na wczesnych etapach rozwoju guza przez przywracanie homeostazy komórkowej, ale także przez ograniczanie niestabilności genetycznej, dostarczanie nukleotydów do replikacji i naprawy DNA, hamowanie stresu oksydacyjnego, zapobieganie stresowi ER (nagromadzeniu agregatów białkowych), przeciwdziałanie powstawaniu lokalnych ognisk zapalnych (Galluzzi i wsp., 2010; Guo i wsp. 2013; Eisenberg-Lerner i wsp., 2009). Ponadto niektóre z białek zaangażowanych w regulację procesu autofagii pełnią funkcję supresorów nowotworzenia, jak np. białko UVRAG, które jest składnikiem kompleksu inicjującego formowanie autofagosomu, a którego mutacje występują w nowotworach jelita grubego (Morselli i wsp. 2009).

Jednym z mechanizmów przeciwdziałania nowotworzeniu przez autofagię jest zdolność do modulowania programowanej śmierci komórki (PCD) (Ryc. 3). Autofagia może umożliwiać apoptozę, co w przypadku nowotworów, może stanowić mechanizm hamujący ich dalszą progresję. Autofagia dostarcza bowiem energii, która jest potrzebna m.in. do formowania ciał apoptotycznych (Eisenberg-Lerner i wsp., 2009). Często białka kluczowe dla apoptozy tj. Bcl-2, Bcl-XL, cFLIP, kaspaza 3, tBid, Bad, PUMA pełnią także rolę w regulacji autofagii (Macintosh i Ryan, 2013; Ryter i wsp., 2014). Ponadto, często indukcja apoptozy nie jest możliwa bez ekspresji białek istotnych dla procesu autofagii, tak jak można to zaobserwować w przypadku komórkowego modelu raka jelita grubego linii RKO, gdzie apoptoza wywołana uszkodzeniami DNA zależna była od aktywacji białka p53 oraz jego białka efektorowego – DRAM-1 (*damage regulated autophagy modulator-1*), pełniącego jednocześnie funkcję regulatora makroautofagii (Crichton i wsp., 2006). Apoptoza oraz nasilona autofagia były również obserwowane pod wpływem substancji bioaktywnej pochodzącej z rozmarynu – karnozolu w badaniach *in vitro* oraz *in vivo* na modelu potrójnie negatywnego raka piersi (*triple-negative breast cancer, TNBC*) nie posiadającego receptorów dla estrogenów, progesteronu i HER2 (Al Dhaheri i wsp., 2014). Autofagia może brać również udział w indukowaniu nekrozy, tak jak miało to miejsce w komórkach raka trzustki linii PANC-1, gdzie związek Green-1, będący pochodną kolchicyny spowodował nagromadzenie w komórkach reaktywnych form tlenu, co w konsekwencji doprowadziło do indukcji nekrozy zależnej od autofagii (Larocque i wsp., 2014).

Przez wielu autorów autofagia jest klasyfikowana jako typ II programowanej śmierci komórki. Dowodem na istnienie odrębnego mechanizmu autofagii jako programowanej śmierci komórki (*autophagic cell death, ACD*) są wyniki badań przeprowadzonych na komórkach raka jelita grubego linii HCT 116 z nieaktywną ścieżką apoptozy (*Bax*<sup>-/-</sup>, *PUMA*<sup>-/-</sup>), w których pod wpływem 5-Fluorouracylu zachodziła programowana śmierć komórki, którą można było zahamować inhibitorem autofagii – 3-metyloadeniną (3-MA) (Xiong i wsp., 2010). Ostatnie doniesienia sugerują również istnienie nowego mechanizmu programowanej śmierci komórki zwanego autozą (*autosis*), zależnego od genów *Atg* aktywowanych podczas autofagii. Autoza jest skutkiem intensywnie zachodzącej autofagii i wyróżnia się unikatowymi cechami morfologicznymi tj. wakuolizacją cytoplazmy, rozdęciem i fragmentacją siateczki śródplazmatycznej oraz rozwarstwieniem i rozdęciem otoczki jądrowej (Liu i Levine, 2015). Z kolei w liniach komórkowych raka wątroby HepG2, HuH-7 a także w ksenogenicznych przeszczepach komórkowych poddanych działaniu wybranych kanabinoidów ( $\Delta$ 9-tetrahydrokannabinol, JWH-015) autofagia indukowana była za pośrednictwem kinaz CaMKK $\beta$  (CaMKK $\beta$ , *Ca*<sup>2+</sup>/*calmodulin-dependent kinase kinase  $\beta$* ) oraz AMPK (*AMP-activated protein kinase*) i w konsekwencji prowadziła do apoptozy, której można było zapobiec stosując inhibitory autofagii. Programowana śmierć komórki zależna od autofagii może więc stanowić odrębny mechanizm lub może towarzyszyć apoptozie (Ryc. 3).

### 2.2.1 Rola autofagii w onkogenezie

Autofagia może także sprzyjać progresji nowotworowej, w szczególności w przypadku komórek, w których już zaszła transformacja nowotworowa. Przykładem takiej sytuacji jest nasilenie autofagii w komórkach ze zmniejszoną wrażliwością na czynniki apoptogenne, co prowadzi do opóźnienia lub uniknięcia programowanej śmierci komórki (Ryc. 3). Ponadto autofagia może uniewrażliwiać komórki na działanie ligandów receptorów śmierci np. TRAIL (*tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) indukujących apoptozę zewnątrzpochodną. Autofagia może zahamować aktywność kaskady sygnałowej apoptozy zależnej od białka p53 uruchamianej w odpowiedzi na uszkodzenia DNA, pomaga także podtrzymać prawidłowe działanie mitochondriów (Guo i wsp., 2013; Green i wsp., 2014). Zauważono, że w tych okolicznościach zablokowanie autofagii często uwrażliwia komórki nowotworowe na indukcję apoptozy lub nekrozy (Macintosh i Ryan, 2013; Bao i wsp., 2012).



Ryc. 3

Schematyczne przedstawienie relacji pomiędzy autofagią i apoptozą (schemat opracowany na podstawie Eisenberg-Lerner i wsp. 2009). (A) Apoptoza i autofagia w roli procesów partnerskich, współpracujących w indukcji śmierci komórki. Autofagia może prowadzić do śmierci komórki niezależnie od apoptozy (1) lub indukcja autofagii może być niezbędna do zajścia apoptozy (2). Apoptoza może także hamować autofagię i w ten sposób prowadzić do śmierci komórki (3). (B) Autofagia i apoptoza mogą współistnieć na zasadzie ograniczonego antagonizmu. Autofagia przeciwdziała indukcji apoptozy np. poprzez usuwanie uszkodzonych organelli komórkowych, a także agregatów utworzonych z wadliwie uformowanych białek, co m.in. ogranicza pogłębianie stresu ER. (C) Autofagia warunkuje zajście zjawisk towarzyszących apoptozie, głównie poprzez dostarczanie energii wymaganej do tego procesu.

Istnieją także liczne doniesienia, które wskazują, że autofagia uruchamiana jest w odpowiedzi na działanie leków przeciwnowotworowych. Na modelu komórkowym raka przełyku linii EC9706 wykazano, że zastosowanie chemioterapii z użyciem cisplatyny wywołało autofagię za pośrednictwem PI3-K III, co ograniczyło wzrost komórek nowotworowych. W tych warunkach zastosowanie inhibitora autofagii – 3-MA, zamiast zahamować, przyspieszyło jednak działanie cisplatyny umożliwiając indukcję apoptozy (Liu i wsp., 2011). W odpowiedzi na bodźce stymulujące programowaną śmierć komórki,

np. powodujące zaburzenia metabolizmu komórkowego, może także dojść do indukcji nekrozy (Jin i wsp., 2007). Jest to częsty przypadek śmierci komórek w nowotworach niewrażliwych na indukcję apoptozy w wyniku konstytutywnie aktywnej ścieżki sygnałowej PI3-K, która pobudza proliferację i wzrost komórek nowotworowych. Wysoka aktywność PI3-K ze względu na aktywną kinazę mTOR (*mammalian target of rapamycin*) uniemożliwia jednocześnie indukcję autofagii (Jin i wsp., 2007).

### 2.3 Molekularne mechanizmy prowadzące do indukcji autofagii w komórkach nowotworowych

Istnieje kilka ścieżek sygnałowych prowadzących do indukcji autofagii w komórkach nowotworowych. Beklina 1, pełniąca centralną rolę w formowaniu błony autofagosomu, została po raz pierwszy zidentyfikowana jako partner białkowy Bcl-2 (Morselli i wsp., 2009). Początkowo uważano, iż białka z rodziny Bcl-2 pełnią ważne funkcje wyłącznie w regulacji apoptozy, jednak późniejsze badania wykazały ich aktywny udział również w modulowaniu autofagii. Udowodniono na przykład, iż antyapoptotyczne białka z rodziny Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w) hamują autofagię, głównie poprzez utworzenie kompleksu z Bekliną 1, blokującego aktywność tej ostatniej (Morselli i wsp., 2009). Ponadto wykazano, iż zahamowanie aktywności Bcl-2 skutkuje indukcją autofagii (Peng i wsp., 2013) oraz, że proapoptotyczne białka z rodziny Bcl-2 posiadające domenę BH3 tj. Bad, Bik, BNIP3L pełnią rolę aktywatorów autofagii uwalniając na drodze kompetycyjnej Beklinę 1 z połączenia z Bcl-2 (Morselli i wsp., 2009). Bcl-2 jest zlokalizowane głównie w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, jądrze komórkowym oraz ER. Oprócz kompleksów z Bekliną 1, białko Bcl-2 może także wchodzić w interakcję z receptorem trifosforanu inozytolu (*inositol trisphosphate receptor, IP3-R*), przez co wpływa na stężenie  $Ca^{2+}$  w ER a także jak już napisano wcześniej moduluje autofagię (Hoyer-Hansen i Jaattela, 2007).

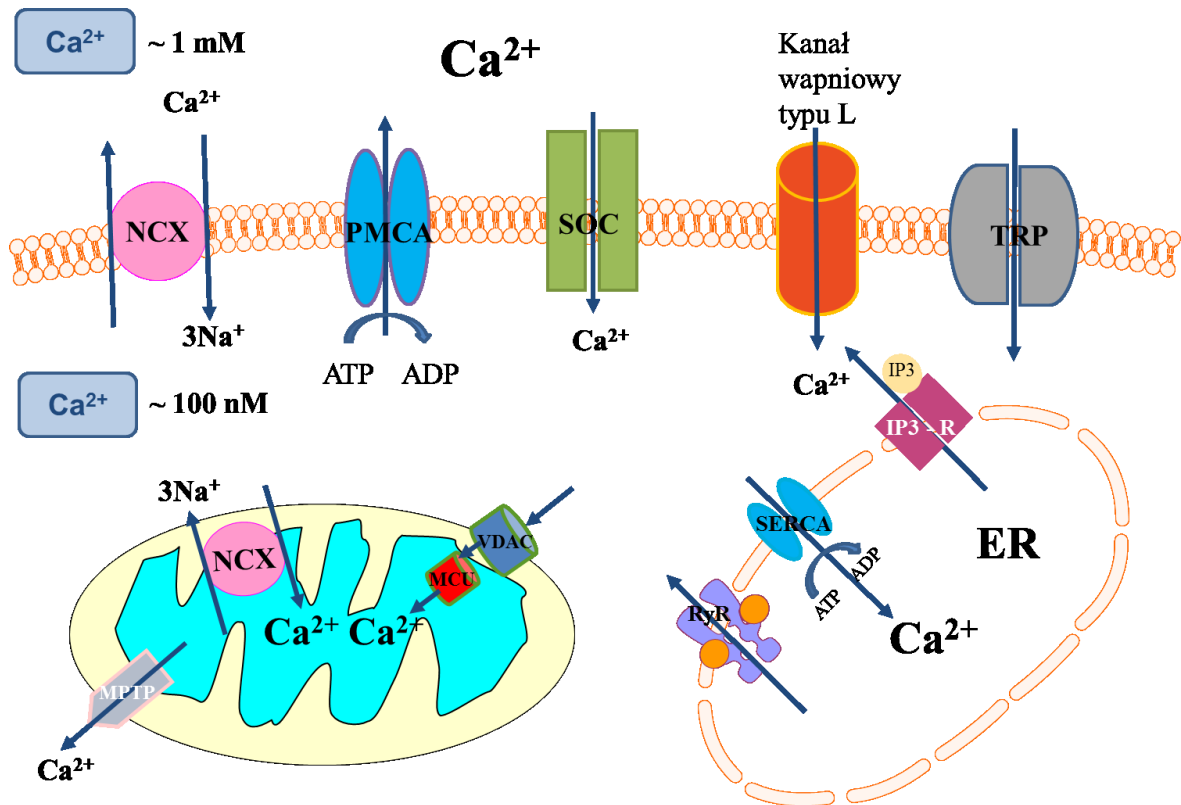
Główna ścieżka sygnałowa prowadząca do indukcji autofagii przebiega za pośrednictwem kompleksu mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*), który składa się z kinazy serynowo-treoninowej mTOR oraz białek regulujących jej aktywność - Raptor, PRAS40 i mLST8 (Ikenoue i wsp., 2009). Autofagia jest indukowana wskutek hamowania aktywności kompleksu mTORC1, a jego aktywność jest z kolei modulowana za pośrednictwem różnych szlaków sygnałowych np. kaskady sygnałowej PI3-K/Akt wrażliwej na obecność czynników wzrostu (Wu i wsp., 2010), ścieżki Raf-1-MEK1/2-ERK1/2 modulowanej dostępnością aminokwasów (Sui i wsp., 2013) lub



przez kinazę AMPK, której aktywność jest zależna od komórkowego poziomu  $\text{Ca}^{2+}$  oraz AMP. Aktywacja AMPK może zatem zajść pod wpływem podwyższenia wskaźnika AMP/ATP towarzyszącego deficytowi dostępnych składników odżywczych lub na drodze zwiększenia puli wolnych jonów wapnia ( $\text{Ca}^{2+}$ ) w cytoplazmie, które stymulują aktywność  $\beta$  kinazy kinazy zależnej od  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmoduliny, która może być aktywatorem AMPK (Hoyer-Hansen i wsp., 2007). Zahamowanie aktywności kompleksu mTORC1 skutkuje jego odłączeniem od błony lizosomu i indukcją autofagii oraz jądrową translokacją czynnika transkrypcyjnego TFEB (*Transcription factor EB*), odpowiedzialnego za indukcję genów regulujących autofagię i aktywność lizosomów (Nixon, 2013).

#### 2.4 Zaangażowanie jonów $\text{Ca}^{2+}$ w regulację autofagii w komórkach nowotworowych

Jony wapnia należą do kluczowych przekaźników drugiego rzędu w szlakach transdukcji sygnału, regulujących podstawowe procesy życiowe komórki tj. przeżycie, proliferację, różnicowanie i programowaną śmierć komórki. Wewnątrzkomórkowe stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  jest utrzymywane na niskim poziomie ok. 0,1-1  $\mu\text{M}$ , podczas gdy stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  w środowisku zewnątrzkomórkowym wynosi ok. 1 mM (Ryc. 4). Dodatkowo wyższe niż w cytozolu stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  występuje w mitochondriach i siateczce śródplazmatycznej. Zaburzenia homeostazy wapniowej (dynamicznej równowagi w stężeniach  $\text{Ca}^{2+}$  w odpowiednich kompartmentach komórki) mogą spowodować zmiany strukturalne i funkcjonalne prowadzące w konsekwencji do śmierć komórki, dlatego zarówno przepływ  $\text{Ca}^{2+}$  przez błonę komórkową jak i wewnątrzkomórkowa dystrybucja  $\text{Ca}^{2+}$  podlegają ścisłej kontroli. W błonie komórkowej znajdują się ATPazy zwane pompami wapniowymi - PMCA (*plasma membrane calcium ATPase*), odpowiedzialne za aktywny transport  $\text{Ca}^{2+}$  wbrew gradientowi stężeń na zewnątrz komórki. Transport  $\text{Ca}^{2+}$  przez błony (komórkową i mitochondrialne) może być także bierny i odbywać się kosztem istnienia różnic potencjału elektrochemicznego dla innego jonu np.  $\text{Na}^+$  przy udziale wymiennika sodowo-wapniowego ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  *antiport*, *NCX*). Uwalnianie  $\text{Ca}^{2+}$  z ER jest z kolei kontrolowane głównie przez kanały formowane przez IP3-R oraz kanały rianodynowe (*ryanodine receptors RyR*), podczas gdy nadmiar  $\text{Ca}^{2+}$  w cytozolu usuwany jest zwrótnie do ER na drodze aktywnego transportu przez pompy wapniowe SERCA



Ryc. 4

Dystrybucja kanałów wapniowych w komórce: IP3-R – receptory trifosforanu inozytolu; MCU – mitochondrialny uniporter wapniowy; NCX – wymiennik (antyporter) Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>; PMCA – ATPaza wapniowa błony komórkowej; MPTP – mitochondrialny por przejściowej przepuszczalności (megakanal); SERCA – ATPaza wapniowa siateczki śródplazmatycznej; SOC – kanały wapniowe aktywowane pojemnościowo; RyR – receptory rianodynowe; VDAC – napięciowo-zależne kanały anionowe; TRP – kanały z grupy receptorów przejściowego potencjału.

(*sarco/endo reticular calcium ATPase*) (Zabłocki i Bandorowicz-Pikuła, 2012). Częściowe opróżnienie magazynów wapnia jakie stanowi siateczka śródplazmatyczna sprzyja aktywacji zlokalizowanych w błonie komórkowej kanałów wapniowych aktywowanych pojemnościowo np. CRACs (*Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channels*) pozwalających na wzmocnienie i przedłużenie pierwotnej odpowiedzi wapniowej poprzez mechanizm zwany SOCE (*store operated calcium channel entry*) (Abdelmohsen i wsp., 2012). W błonie komórkowej rozlokowane są również napięciowo-zależne kanały wapniowe. Poszczególne kanały: L, N, P, Q, R, T różnią się od siebie wartościami napięć elektrycznych aktywujących oraz czasami trwania aktywności kanałów (Zabłocki i Bandorowicz-Pikuła, 2012). Dodatkowo napływ jonów Ca<sup>2+</sup> ze środowiska zewnątrzkomórkowego oraz uwalnianie Ca<sup>2+</sup> z organelli komórkowych mogą być regulowane przez kanały TRP (*transient receptor potential channels*).

We wnętrzu komórki jony wapnia oddziałują wielokierunkowo, aktywując lub inaktywując szereg białek regulatorowych, takich jak: enzymy, czynniki transkrypcyjne czy białka opiekuńcze. Deregulacja homeostazy wapniowej może również prowadzić do indukcji apoptozy i/lub autofagii (Hoyer-Hansen i Jaattela, 2007). Hoyer-Hansen i wsp. (2007) zaobserwowali zależną od autofagii śmierć komórek raka piersi linii MCF-7 pod wpływem czynników zwiększających stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  w cytoplazmie: witaminy D i jej analogu EB 1089, ATP, jonomycyny i tapsygarginy. W przeprowadzonych doświadczeniach jony  $\text{Ca}^{2+}$  uwolnione z wewnętrznych magazynów wapnia oraz pochodzące z puli zewnątrzkomórkowej aktywowały kinazę  $\text{CaMKK}\beta$ , która aktywując kinazę AMPK prowadziła do inaktywacji kompleksu mTORC1.

Jedną z najlepiej poznanych ścieżek sygnałowych prowadzących do indukcji autofagii za pośrednictwem modulacji  $\text{Ca}^{2+}$  jest kaskada IP3-R/Beklina 1/Bcl-2 (Vicencio i wsp., 2009). W tym przypadku aktywacja autofagii jest zależna od mTOR i pobudzana jest jako odpowiedź na stres siateczki śródplazmatycznej w tym reakcję odpowiedzi na nagromadzenie nieufornowanych lub źle uformowanych białek w ER - UPR (*Unfolded Protein Response*). IP3-R jest receptorem dla IP3, który pełni w komórce rolę wtórnego przekaźnika sygnałów a także jest czynnikiem zaangażowanym w regulację apoptozy. Wykazano, że użycie ksestosponginy B, agonisty IP3-R, powodowało indukcję autofagii poprzez rozbitcie połączeń w kompleksie IP3-R-Beklina 1 i następcze uwolnienie Bekliny 1. Aktywność kompleksu IP3-R-Beklina 1 może również podlegać hamowaniu przez białko Bcl-2 obecne w ER, które konkurencyjnie wiąże Beklinę 1 (Vicencio i wsp., 2009). Ponadto wykazano, że w komórkach HeLa traktowanych rapamycyną jony  $\text{Ca}^{2+}$  napływające z ER przez kanały IP3-R indukowały autofagię zależną od mTOR (Decuypere i wsp., 2013).

Blokowanie napięciowo-zależnych kanałów wapniowych typu T i L może również prowadzić do indukcji autofagii w komórkach nowotworowych. Ponadto, aktywowane napięciem kanały wapniowe typu L oraz T, występują licznie w wielu typach nowotworów (Chen i wsp., 2014, Rim i wsp., 2014, Santoni i wsp., 2012). Wykazano, iż nieswoisty inhibitor kanałów wapniowych typu L – werapamil wywołał autofagię w komórkach gruczolakoraka okrężnicy linii COLO 205 widoczną w obrazie ultrastrukturalnym (Pająk i wsp., 2012). Inny inhibitor kanałów wapniowych typu L – nifedypina upośledzał proliferację i migrację komórek nowotworowych endometrium linii HEC-1A (Bao i wsp., 2012). W przedstawionych badaniach nifedypina indukowała

autofagię, jednak jednoczesne użycie inhibitora autofagii – 3-MA spowodowało dodatkowo indukcję apoptozy (Bao i wsp., 2012). Kanały wapniowe typu T, jako regulatory dostępności zewnątrzkomórkowej puli  $Ca^{2+}$ , pełnią ważną funkcję w regulacji proliferacji i różnicowania komórek. Zhang i wsp. (2012) wykazali, iż użycie endostatyny (c-końcowego fragmentu kolagenu XVIII) ograniczyło proliferację i migrację ludzkich komórek glejaka linii U87. Spowodowane było to zablokowaniem kanałów typu T, nie miało jednak związku z aktywnością kanałów typu L. Inhibitory błonowych napięciowo-zależnych kanałów wapniowych hamują napływ jonów wapnia do wnętrza komórki, jednak niektóre z tych substancji mogą również wpływać na ścieżki sygnałowe zaangażowane w indukowanie śmierci komórek. Związek KYS 05090 *{[3-(1,1'-biphenyl-4-yl)-2-(1-methyl-5-dimethylaminopentylamino)-3,4-dihydroquinazolin-4-yl]-N-benzylacetamide 2 hydrochloride}*, będący inhibitorem kanałów typu T, wywoływał programowaną śmierć komórek gruczolakoraka płuc linii A549 hamowaną zarówno przez inhibitor autofagii – bafilomycynę A jak i pankaspazowy inhibitor apoptozy - zVAD-fmk. Niezależnie od obniżenia wewnątrzkomórkowej puli  $Ca^{2+}$ , KYS 05090 redukował także dokomórkowy transport glukozy oraz powodował podwyższenie produkcji reaktywnych form tlenu (Rim i wsp., 2014). Tetrandryna, antagonistka kanałów T i L, okazała się skutecznym inhibitorem autofagii na etapie degradacji lizosomalnej a także upośledziła dokomórkowy transport glukozy oraz wywołała apoptozę w komórkach raka stercza linii PC-3 i w ksenograftach nowotworowych (Qiu i wsp., 2014).

CRAC zaliczany do kanałów wapniowych aktywowanych pojemnościowo jest uznawany za główny kanał regulujący wewnątrzkomórkową pulę jonów  $Ca^{2+}$ . CRAC jest zbudowany z białek strukturalnych należących do rodziny ORAI (ORAI 1, ORAI 2, ORAI 3) oraz białka pełniącego funkcję sensora  $Ca^{2+}$  - STIM (*sensor stromal interaction molecule*). Wyciszenie genu *Orai 1* jak również zastosowanie inhibitorów CRAC hamowało proliferację szczurzych (C6) i ludzkich (U251) komórek glejaka (Liu i wsp., 2011). W komórkach HeLa wyciszenie genów *Orai 1* oraz ATP-azy transportującej jony  $Ca^{2+}$  - *ATP2C1* spowodowało zwiększenie puli  $Ca^{2+}$  w cytoplazmie oraz indukowało autofagię (Abdelmohsen i wsp. 2013).

Kanały z rodziny TRP mogą być aktywowane przez różne czynniki chemiczne, mechaniczne a nawet fizyczne np. temperaturę, co wyjaśnia ich zaangażowanie w regulację wielu procesów komórkowych m.in. takich jak proliferacja czy apoptoza (Shapovalov i wsp., 2011). Do rodziny kanałów TRP zalicza się kanały TRPC, TRPV,

TRPM, TRPML, TRPA oraz TRPP, które różnią się między sobą rodzajem receptora. Jednym z najlepiej scharakteryzowanych dotychczas kanałów jest TRPV6, który cechuje się wysoką przepuszczalnością dla jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i jest zaangażowany w regulację mechanizmów pojemnościowego napływu jonów wapnia – SOCE. Ponadto zwiększony poziom mRNA dla TRPV6 zaobserwowano w nowotworach stercza, jelita grubego oraz białaczki szpikowej a wyciszenie TRPV6 w komórkowym modelu raka stercza skutkowało zmniejszeniem proliferacji komórek (Shapovalov i wsp., 2011). Podobnie nadekspresję kanału TRPV1 zaobserwowano w wielu typach nowotworów m.in. stercza, jelita grubego oraz trzustki. Przeprowadzone badania na modelach komórkowych wskazują na udział tego kanału w regulacji napływu jonów  $\text{Ca}^{2+}$  ze środowiska zewnątrzkomórkowego oraz w indukowaniu apoptozy (Shapovalov i wsp., 2011). Ponadto TRPV1 jest uznawany za potencjalny regulator autofagii za pośrednictwem jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i aktywacji AMPK (Kondratskyi i wsp., 2013).

## 2.5 Rola metabolizmu glukozy w indukcji autofagii w komórkach nowotworowych

Większość komórek nowotworowych wytwarza ATP na drodze uwalniania energii z substratów w szlaku oddychania beztlenowego czyli glikolizy wytwarzającej kwas pirogronowy redukowany do kwasu mlekowego (Wu i wsp., 2012; Christofk i wsp., 2008). Z uwagi na fakt, że jest to mniej wydajny sposób pozyskiwania energii z substratów niż oddychanie tlenowe (fosforylacja oksydacyjna), komórki nowotworowe charakteryzuje podwyższona aktywność metaboliczna wynikająca z konieczności utrzymania dostatecznego poziomu ATP. Ta cecha komórek nowotworowych nosi nazwę „efektu Warburga” i przejawia się głównie podwyższonym wychwytem glukozy przez komórki nowotworowe połączonym z intensywną produkcją kwasu mlekowego, który zapewnia niskie pH odpowiednie do aktywacji procesów wzrostu guza (Strigun i wsp., 2011). Efekt Warburga był obserwowany w konsekwencji mutacji, które zaszyły w onkogenach m.in. *Ras* czy *Akt* wpływających pobudzająco na pobieranie glukozy i transkrypcję genów enzymów glikolitycznych (Lozy i Karantza, 2012). Ponadto Christofk i wsp. (2008) wykazali, że komórki nowotworowe cechuje ekspresja izoformy M2 kinazy pirogronianowej, która jest odpowiedzialna za zwiększoną produkcję kwasu mlekowego a także proces nowotworzenia, gdyż zastąpienie izoformy M2 charakterystyczną dla komórek nietransformowanych izoformą M1 skutkowało odwróceniem efektu Warburga oraz mniejszą zdolnością do formowania guzów w ksenograftach nowotworowych u myszy.

Transport glukozy przez błonę komórkową jest pierwszym czynnikiem limitującym jej dostępność dla komórki i odbywa się za pośrednictwem specjalnej grupy białek – transporterów glukozy (GLUT) (Macheda i wsp., 2005). Zwiększona aktywność niektórych transporterów GLUT może być odpowiedzialna za podwyższone pobieranie glukozy i intensyfikację glikolizy w komórkach nowotworowych. Wiadomo, iż transporter GLUT1, który odpowiada za transport glukozy zarówno na poziomie podstawowym, jak i pod wpływem czynników indukujących stres komórkowy, jest liczniej reprezentowany w komórkach nowotworów mózgu, szyi i głowy, pęcherza, nerki, jelita grubego, płuc i jajników niż w komórkach prawidłowych (Macheda i wsp., 2005). Ponadto Krześlak i wsp. (2012) opisali zaangażowanie transporterów GLUT1 i GLUT3 w transport glukozy do ludzkich komórek raka endometrium i piersi. W transporcie glukozy do komórek nowotworowych biorą również aktywny udział inne białka błonowe takie jak zależny od  $\text{Na}^+$  kotransporter glukozy (SGLT1). Nadekspresja SGLT1 została opisana w raku jelita grubego, co korelowało z zaawansowanym stadium tego nowotworu (Guo i wsp., 2011). Wykazano także zaangażowanie tego białka w transport glukozy w komórkach raka jelita grubego linii Caco-2 (MacDonald i wsp., 1993).

Rozwój nowotworów jest szczególnie zależny od dostępności glukozy a ich tolerancja na głodzenie jest związana m.in. z aktywnością onkogenów i supresorów nowotworzenia. Jednym z genów ostatnio scharakteryzowanych jako potencjalny supresor nowotworzenia jest kaweolina 1 (*Cav1*) (Han i wsp., 2009). Białko CAV1, będące integralnym białkiem błony komórkowej niezbędnym do utworzenia zagłębień zwanych kaweolami, w których zachodzi endocytoza niezależna od receptorów. Pełni ono funkcję regulatora wzrostu komórki a jego ekspresja jest często wyższa w zaawansowanych stadiach nowotworów. W testowanych tkankach oraz liniach nowotworowych ludzkiego raka jelita grubego wyciszenie genu *Cav1* wywołało autofagię za pośrednictwem aktywacji AMPK oraz zablokowało cykl komórkowy w fazie G1 na drodze zależnej od białka p53. Co więcej, zaobserwowano wówczas obniżenie wchłaniania glukozy oraz zmniejszenie produkcji kwasu mlekowego oraz ATP. Prawdopodobnie zwiększona ekspresja CAV1 w badanych nowotworach jelita grubego ma związek z podwyższeniem tempa metabolizmu pobudzonym dzięki zwiększonej transkrypcji genu *Glut3* (Ha i wsp., 2012). Innym supresorem nowotworzenia zaangażowanym w regulację metabolizmu glukozy jest białko HIPK2 (*homeodomain-interacting protein kinase 2*), którego aktywacja pod wpływem różnych czynników stresowych może doprowadzić do śmierci komórki.

Wykazano, iż komórki raka jelita grubego linii RKO z wyciszonym genem *Hipk2* indukowały autofagię, co umożliwiało im przetrwanie w warunkach ograniczenia podaży glukozy.

Pozbawienie komórek nowotworowych lub ograniczenie dostępu do glukozy nie tylko hamuje ich wzrost i proliferację, ale może także prowadzić do eliminacji komórek nowotworowych, co jest często obserwowane w badaniach przedklinicznych. W mysim komórkowym modelu raka piersi linii 4T1 pozbawienie komórek dostępu do glukozy w pożywce spowodowało indukcję programowanej śmierci komórkowej w ciągu 24 godzin (Wu i wsp., 2012). Niekiedy redukcja stężenia glukozy w pożywce może także prowadzić do indukcji autofagii. W opisanych warunkach głodzenia komórek aktywność kompleksu mTORC1 jest hamowana przez aktywną kinazę AMPK, co indukuje autofagię i umożliwia uzupełnienie zapasów energetycznych. W komórkach raka stercza linii PC-3 i LNCaP głodzenie poprzez zastąpienie w pożywce glukozy jej niemetalizowanym syntetycznym analogiem – 2-dezoksyglukozą (2-DG), podwyższyło ekspresję Bekliny 1 oraz MAP LC3-II, co świadczy o indukcji autofagii (DiPaola i wsp., 2008). Autofagia była również indukowana pod wpływem działania kanabinoidów w komórkach gruczolakoraka trzustki linii PANC-1. W tym przypadku, aktywacja AMPK miała miejsce za pośrednictwem reaktywnych form tlenu, co prowadziło do zahamowania aktywności kaskady sygnałowej Akt/c-Myc i w konsekwencji doprowadziło do upośledzenia cyklu Krebsa i szlaku glikolizy (Dando i wsp., 2013). W komórkach szpiczaka linii MM.1S obniżenie wychwytu glukozy wywołane działaniem 8-aminoadenozyny spowodowało indukcję stresu metabolicznego i autofagii, która przyczyniła się do podwyższenia lekooporności komórek. Dopiero jednoczesne zastosowanie 8-aminoadenozyny z inhibitorami autofagii umożliwiło indukcję apoptozy, którą można było jednak zahamować podwyższając ekspresję GLUT1 (Shanmugam i wsp., 2009). Stres siateczki śródplazmatycznej również może być czynnikiem zaburzającym metabolizm glukozy w komórkach nowotworowych. W komórkach układu krwiotwórczego opornych na apoptozę ( $Bak^{-/-}$   $Bax^{-/-}$ ) poddanych działaniu inhibitora glikozylacji białek i induktora stresu siateczki śródplazmatycznej – tunikamycyny, zaobserwowano upośledzenie kaskady sygnałowej Akt oraz obniżenie ekspresji GLUT1, jak również ograniczenie wchłaniania glukozy powiązane ze zmniejszoną produkcją kwasu mlekowego oraz ATP. Ponadto w opornych na apoptozę komórkach zaobserwowano nasilenie autofagii (Wang i wsp., 2011).

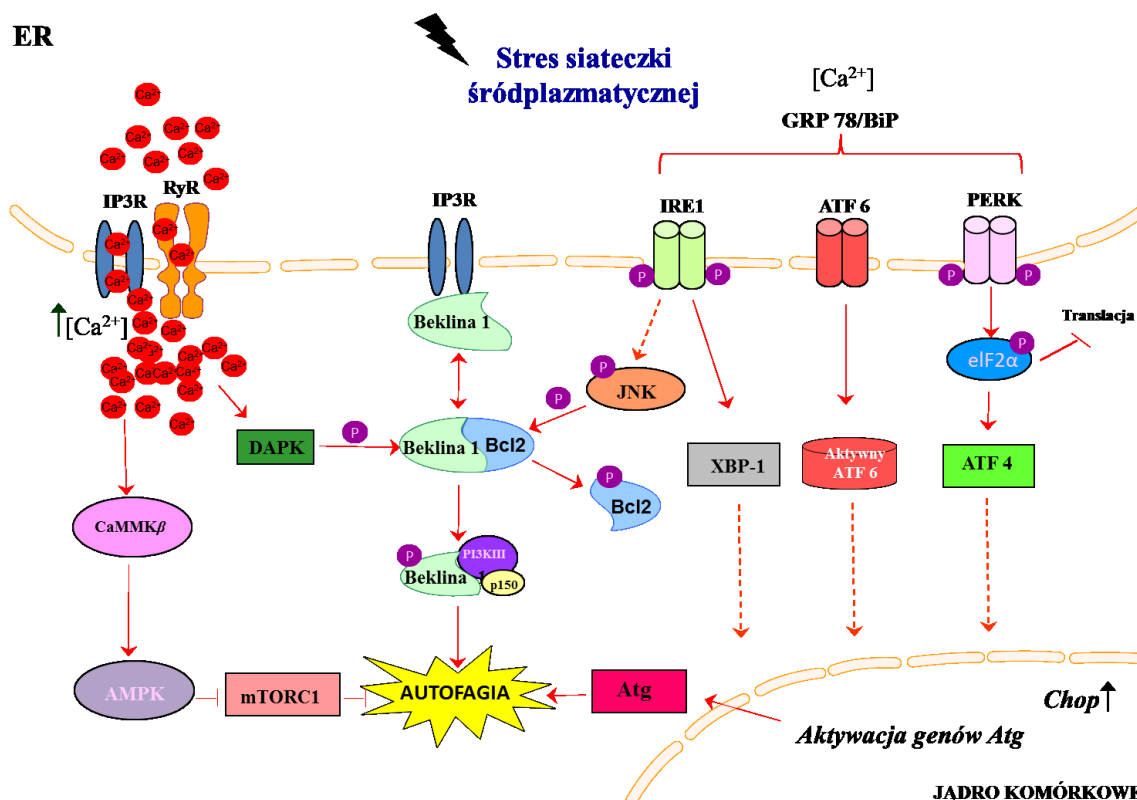
## 2.6 Autofagia indukowana w komórkach nowotworowych za pośrednictwem stresu siateczki śródplazmatycznej

Siateczka śródplazmatyczna (ER) pełni funkcję magazynu jonów  $\text{Ca}^{2+}$  na terenie komórki. Ponadto w świetle ER panują warunki prooksydacyjne, umożliwiające formowanie mostków dwusiarczkowych a także zachodzi prawidłowe dojrzewanie nowo zsyntetyzowanych białek błonowych oraz wydzielniczych. W wielu sytuacjach np. wskutek zaburzeń reakcji utleniania i redukcji w komórce, niewystarczającej ilości substratów do glikozylacji białek, niedoboru jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , czy infekcji wirusami, dochodzi do aktywacji stresu ER, w tym (a) indukcji odpowiedzi na białka nieprawidłowo uformowane – UPR, polegającej na przywracaniu zdolności do przekształceń przestrzennych łańcuchów polipeptydowych i innych modyfikacji białek na drodze zależnej od transkrypcji syntezy białek opiekuńczych (czaperonów) i innych składników aparatu wydzielania z siateczki śródplazmatycznej, (b) degradacji nieprawidłowo uformowanych białek siateczki (*ER-associated degradation*, ERAD) zależnej od proteasomu i (c) regulacji procesów translacji na rybosomach w celu uniknięcia dalszego eksportu niedojrzałych białek do światła siateczki śródplazmatycznej (Boyce i Yuan 2006). W konsekwencji zahamowana zostaje synteza białek wymagających dojrzewania w ER natomiast nasila się produkcja białek potrzebnych do prawidłowego formowania, czyli białek opiekuńczych siateczki śródplazmatycznej (Xu i wsp., 2005). Przedłużający się w czasie stres ER może prowadzić do nieodwracalnych zmian strukturalnych a nawet do indukcji programowanej śmierci komórki. Meister i wsp. (2010) opisali wzmożoną indukcję stresu ER prowadzącą do zależnej od aktywności kaspaz śmierci komórek szpiczaka po zastosowaniu w terapii łączonej werapamilu i bortezomibu - inhibitora degradacji proteasomalnej. W komórkach nowotworowych nasilenie autofagii pod wpływem zaburzeń gospodarki wapniowej oraz z powodu braku dostępu do substratów energetycznych może być następstwem przedłużającego się stresu ER, w tym aktywacji kaskady UPR (Hoyer-Hansen i wsp., 2007).

Podczas indukcji autofagii za pośrednictwem stresu ER (Ryc. 5), uwolnieniu Bekliny 1 z hamujących jej aktywność kompleksów z IP3-R lub Bcl-2 sprzyja zablokowanie IP3-R lub pobudzenie aktywności kinaz regulatorowych np. CaMKK $\beta$  czy DAPK (*death-dependent protein kinase*) przez wypływające z ER jony  $\text{Ca}^{2+}$ . Istotną rolę w indukowanej za pośrednictwem stresu ER autofagii może także odgrywać kinaza AMPK aktywowana przez CaMKK $\beta$ , bądź przez wysokie stężenie AMP w komórce (obniżenie



poziomu ATP). AMPK hamuje aktywność kompleksu mTORC1, głównego „hamulca” autofagii co prowadzi do jej indukcji (Hoyer-Hansen i wsp., 2007). Do najważniejszych mediatorów stresu ER należą błonowe białka siateczki – IRE1 (*Inositol-requiring enzyme 1*), PERK (*RNA-dependent protein ER kinase*) oraz ATF6 (*activating transcription factor 6*), które pełnią funkcje czujników (sensorów) poziomu niewłaściwie uformowanych białek w świetle siateczki i przekazują sygnał o podwyższeniu ich stężenia do jądra komórkowego. Aktywacji czujników sprzyja obniżenie stężenia  $Ca^{2+}$  w siateczce (Ogata i wsp., 2006) oraz odłączenie białka opiekuńczego GRP78/BiP (*78 kDa glucose-regulated protein*), umożliwiające autofosforylację tych pierwszych (Bennett i wsp., 2010). Aktywna kinaza PERK fosforyluje podjednostkę  $\alpha$  czynnika inicjacji translacji eIF2 $\alpha$  (*eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$* ), w wyniku czego synteza białek na rybosomach zostaje zahamowana (Avivar-Valderas i wsp., 2011). Za pośrednictwem aktywacji kinazy PERK oraz czynnika transkrypcyjnego ATF4, ulega także aktywacji czynnik transkrypcyjny CHOP (*C/EBP-homologous protein*), który pełni istotną rolę w regulacji translacji oraz w przekierowaniu komórki na tor apoptozy (Li i wsp., 2008). Podwyższony poziom CHOP podczas stresu ER i towarzyszącej mu reakcji UPR może również wpływać na regulację autofagii poprzez obniżenie ekspresji Bcl-2 (Hoyer-Hansen i Jaattela., 2007; Luo i Lee, 2013). Ponadto ATF4 aktywuje transkrypcję genu *Map1lc3B* a CHOP transkrypcję genu *Atg 5*, zaś ekspresja tych genów jest konieczna do indukcji autofagii (Rouschop i wsp., 2010). Aktywacja IRE1 i ATF6 prowadzi z kolei do indukcji transkrypcji docelowych genów UPR odpowiedzialnych za syntezę białek opiekuńczych np. GRP78/BiP a także białek związanych z systemem degradacyjnym siateczki – ERAD (Ogata i wsp., 2006). Dodatkowo IRE1 może nasilać fosforylację Bekliny 1 pobudzając aktywność kinazy JNK (*c-Jun NH2-terminal kinase*) (Cheng i wsp., 2014)(Ryc. 5).



Ryc. 5

Autofagia aktywowana za pośrednictwem stresu ER i towarzyszącej mu reakcji UPR (Unfolded Protein Response) (schemat opracowany na podstawie Kania i wsp., 2015). AMPK – *AMP-activated protein kinase*; ATF4/6 - *Activating transcription factor 4/6*; Atg - *Autophagy-related genes*, Bcl-2 - *B-cell lymphoma 2*; CaMKKβ - *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase kinase β*; CHOP - *C/EBP-homologous protein*; DAPK - *Death-associated protein kinase*; eIF2α - *Eukaryotic initiation factor*; GRP78/BiP - *78 kDa glucose-regulated protein*; IP3-R - *Receptor trifosforanu inozytoli, Inositol triphosphate receptor*; IRE1 - *Inositol-requiring enzyme 1*; JNK - *c-Jun NH2-terminal kinase*; mTORC1 - *Mammalian target of rapamycin complex 1*; PI3K III - *3-kinaza fosfatydiloinozytoli, Phosphoinositide 3-kinase*; RyR - *Receptor rianodynowy, Ryanodine receptor*; XBP-1 - *X-box binding protein 1*.

W komórkach nowotworowych ilość wadliwych białek jest często wyższa z powodu licznych mutacji w genach oraz szkodliwego oddziaływania mikrośrodowiska komórki, które nie sprzyja prawidłowemu dojrzewaniu białek. Ponadto stres siateczki może być także indukowany w odpowiedzi na działanie leków przeciwnowotworowych. Salazar i wsp. (2009) opisali indukcję autofagii i programowanej śmierci komórek glejaka *in vitro* oraz *in vivo* pod wpływem tetrahydrokannabinolu (THC). THC spowodowało fosforylację czynnika eIF2α prowadzącą do indukcji stresu ER oraz autofagii zależnej od zablokowania ścieżki sygnałowej Akt/mTORC1. Co więcej, chemiczne zablokowanie autofagii oraz genetyczna inaktywacja tego procesu zniosły działanie THC (Salazar i wsp., 2009). Także wewnątrzkomórkowy niedobór jonów wapnia może powodować opróżnienie jego zapasów obecnych w ER, co może z kolei upośledzać procesy dojrzewania białek,

gdyż niektóre z białek opiekuńczych ER takich jak GRP78/BiP czy kalretikulina są zależne od  $\text{Ca}^{2+}$  (Xu i wsp., 2005). Badania przeprowadzone na komórkach raka jelita grubego linii HCT 116 z użyciem inhibitora proteasomu MG132 wykazały indukcję stresu ER oraz autofagii z towarzyszącym zwiększeniem stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w cytoplazmie. Zastosowanie chelatora wewnątrzkomórkowej puli jonów  $\text{Ca}^{2+}$  - BAPTA-AM zapobiegło akumulacji  $\text{Ca}^{2+}$  w cytoplazmie, wakuolizacji cytoplazmy oraz indukcji stresu ER, nie uchroniło natomiast komórek HCT 116 przed apoptozą wywołaną przez zablokowanie proteosomalnej degradacji białek (Williams i wsp., 2013).

Podczas procesu dojrzewania większość białek wymaga obecności  $\text{Ca}^{2+}$  do prawidłowego formowania, jednak na terenie ER zachodzą także zależne od glukozy procesy fałdowania białek. Glukoza obok mannozy i N-acetyloglukozaminy jest źródłem reszt cukrowych w procesie N-glikozylacji, której podlega 80% białek syntetyzowanych w siateczce śródplazmatycznej szorstkiej (Agostinis i Samali, 2012). Nagromadzenie niedojrzałych strukturalnie białek w kanalikach ER wskutek zaburzenia gospodarki wapniowej czy niedoboru glukozy może być bezpośrednią przyczyną stresu ER oraz uruchomienia kaskady sygnałowej UPR. Dowiedziono, iż zastosowanie niemetabolizowanego analogu glukozy – 2-DG wywołało stres ER i autofagię w komórkach raka trzustki, szpiczaka oraz raka piersi. Ponadto 2-DG nie tylko blokowała glikolizę a w konsekwencji syntezę ATP, lecz także upośledzała proces glikozylacji, gdyż podanie mannozy, która również jest substratem w reakcji glikozylacji białek, zahamowało stres siateczki i autofagię (Xi i wsp., 2011). Autofagia jest odpowiedzialna za proces selektywnej degradacji białek w ramach tzw. kontroli jakości N-glikozylowanych białek na terenie ER. Wykazano, iż w komórkach raka jelita grubego linii HT-29 większość nieprawidłowych N-glikozylowanych białek dojrzewających w siateczce śródplazmatycznej jest degradowana w procesie autofagii, albowiem zablokowanie glikozydaz ER hamowało ten proces (Ogier-Denis i wsp., 2000).

Wydaje się, że różne ścieżki komórkowego przekazywania sygnałów mogą się wzajemnie krzyżować. Tak na przykład proces autofagii indukowanej przez zablokowanie komórkom dostępu do substratów energetycznych może zależeć od sygnału wapniowego na drodze zależnej od IP3-R (Decuypere i wsp., 2013). Zarówno zaburzenia gospodarki wapniowej jak i dokomórkowego transportu glukozy mogą prowadzić do indukcji stresu ER, w tym UPR. Dowodem na to są badania przeprowadzone na mysich fibroblastach przy

użyciu tapsygarginy - inhibitora ATPaz SERCA oraz tunikamycyny – inhibitora N-glikozylacji, które w obu przypadkach wywołały stres ER (Ogata i wsp., 2006).

## 2.7 Rola białek opiekuńczych siateczki śródplazmatycznej w regulacji autofagii

Białka opiekuńcze rezydujące w siateczce śródplazmatycznej pełnią istotną rolę w kontrolowaniu N-glikozylacji nowo zsyntetyzowanych białek. W pierwszej kolejności, podczas procesu dojrzewania białek, polipeptydy wprowadzone do ER są rozpoznawane przez białka opiekuńcze GRP78/BiP, czy kalneksynę i kalretikulinę (Ogier-Denis i wsp., 2000) a także białka zaangażowane w formowanie mostków dwusiarczkowych jak PDI (*protein disulfide isomerase*) (Luo i Lee, 2013). Interakcja dojrzewających białek z białkami opiekuńczymi trwa aż do momentu przetransportowania ich do Aparatu Golgiego gdzie podlegają dalszym przekształceniom. Niedojrzałe lub błędnie przekształcone białka są degradowane przez system degradacji ERAD złożony z proteasomów współpracujących z ER (Ogier-Denis i wsp., 2000). W celu ochrony przed nagromadzeniem się wadliwych białek lub w celu przyspieszenia ich degradacji, czynniki transkrypcyjne ATF4, ATF6, XBP-1, CHOP aktywowane przez UPR zwiększają ekspresję białek opiekuńczych ER, enzymów biorących udział w dojrzewaniu białek oraz białek wchodzących w skład systemu degradacji proteasomalnej (Li i wsp., 2008). Zwiększoną ekspresję CHOP a także GRP78/BiP obserwowano w przypadkach aktywacji PERK, IRE1 i ATF6 w czasie stresu ER wywołanego ginsengozidem (*Compound K*) w ludzkich komórkach raka jelita grubego HT-29 (Zhang i wsp., 2013). Oprócz zaangażowania w proces prawidłowego dojrzewania białek, GRP78/BiP bierze również udział w regulacji transportu białek przez błony ER, a także kontroluje szereg procesów kluczowych dla progresji nowotworowej takich jak proliferacja, angiogeneza, chemowrażliwość, autofagia i apoptoza (Luo i Lee, 2013; Huang i wsp., 2011; Xing i wsp., 2011). Poziom białka GRP78/BiP oraz jego mRNA jest regulowany dostępnością glukozy oraz stężeniem jonów  $Ca^{2+}$  (Kitzman i wsp., 1996; Wang i wsp., 2008; Wong i wsp., 2013). W warunkach fizjologicznych GRP78/BiP jest przyłączane do ATF6, IRE1 i PERK znajdujących się w błonie ER. Podczas stresu ER wzrasta ilość wadliwie uformowanych białek w świetle siateczki, co skutkuje odłączeniem GRP78/BiP od ATF6, IRE1 i PERK i prowadzi do uruchomienia kaskady UPR. Po uwolnieniu kinaz IRE1 i PERK ich aktywacja odbywa się na drodze autofosforylacji. Białko ATF6 zostaje natomiast przetransportowane do aparatu Golgiego, gdzie podlega proteolitycznemu przekształceniu do formy aktywnej (Bennett i wsp., 2010).

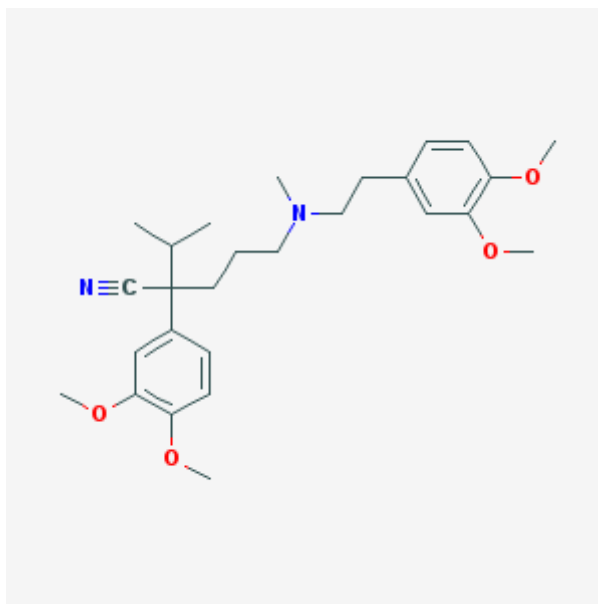
Podczas autofagii zależnej od stresu ER indukowanego pod wpływem cis-platyny, 2-DG, promieniowania jonizującego i tunikamycyny, zwiększoną ekspresję GRP78/BiP obserwowano w komórkach ludzkiego nowotworu jamy nosowo-gardłowej (Song i wsp., 2013). Białko GRP78/BiP odgrywało także kluczową rolę podczas autofagii indukowanej inhibitorem kinazy B-Raf stosowanym samodzielnie lub w połączeniu z inhibitorem MEK, w biopsjach tkankowych oraz liniach komórkowych izolowanych z nowotworów pacjentów chorych na szpiczaka wywodzącego się z mutacji w genie *B-Raf* (Ma i wsp., 2014). Dalsze badania wykazały, iż w przypadku nowotworów niewrażliwych na blokowanie kinazy B-Raf, poziom autofagii był wyższy, co może przyczyniać się do podwyższenia lekooporności. Zastosowany inhibitor B-Raf promował wiązanie zmutowanego białka B-Raf do białka opiekuńczego GRP78/BiP, co umożliwiała indukcję stresu siateczki, reakcji UPR i autofagii pełniącej funkcję ochronną, albowiem jej zahamowanie poprawiało skuteczność terapii (Ma i wsp., 2014). Ponadto Li i wsp. (2008) wykazali iż obecność GRP78/BiP jest konieczna do aktywacji odpowiedzi UPR oraz następczej autofagii w komórkach raka szyjki macicy linii HeLa, gdyż wyciszenie GRP78/BiP przez siRNA uniemożliwiło formowanie autofagosomów pod wpływem stresu ER oraz głodzenia komórek. Z kolei Bennett i wsp., 2010 opisali krótkotrwałe zwiększenie ekspresji GRP78/BiP zależne od receptora androgenowego w komórkach raka stercza LNCaP hodowanych w pożywce pozbawionej surowicy, które wpływało na stabilizację ER i opóźniało indukcję autofagii oraz programowanej śmierci komórki.

Innym białkiem opiekuńczym niezależnym od ATP, związanym z utrzymaniem homeostazy ER jest klasteryna (CLU), będąca heterodimerskim, wysoce konserwowanym białkiem, posiadającym wiązania dwusiarczkowe oraz resztę cukrową. Podczas procesu dojrzewania sekrecyjna forma CLU (sCLU) podlega intensywnej glikozylacji, co prawdopodobnie ma związek z pełnioną przez to białko funkcją cytoprotekcyjną oraz zapobiega agregacji białek (Stewart i wsp., 2007). Jądrowa forma CLU (nCLU) nie podlega glikozylacji i jest zaangażowana w indukcję apoptozy (O'Sullivan i wsp., 2003). Ponieważ formowanie prawidłowej struktury CLU jest złożone i zależy od procesów zachodzących na terenie ER oraz aparatu Golgiego, CLU wydaje się być białkiem szczególnie wrażliwym na stres siateczki. Kang i wsp., 2013 wykazali akumulację nieglikozylowanej, ale innej niż jądrowa izoformy CLU na terenie ER, co potwierdza rolę N-glikozylacji w ochronie przed utworzeniem nieprawidłowej formy CLU. Ponadto nagromadzenie nieglikozylowanej formy CLU w świetle ER, może być

czynnikiem pogłębiającym chroniczny stres siateczki (Kang i wsp., 2013). Rola CLU jest także związana z wewnątrzkomórkowym poziomem jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Przypuszcza się iż w przypadku niedoboru  $\text{Ca}^{2+}$  w komórce, CLU jest transportowana do jądra komórkowego gdzie przyczynia się do indukcji apoptozy, natomiast zwiększony poziom  $\text{Ca}^{2+}$  w cytoplazmie promuje wydzielanie CLU o właściwościach ochronnych do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Pająk i Orzechowski., 2009). Zwiększony poziom komórkowej CLU zidentyfikowano m.in. w raku piersi, jelita grubego, płuc, stercza (Pucci i wsp., 2004; Powolny i wsp., 2011). Liczne doniesienia wskazują na rolę CLU w regulacji kancerogenezy, stabilizacji nowotworów, mechanizmów adhezji komórek, cyklu komórkowego, apoptozy a także autofagii (O'Sullivan i wsp., 2003; Moretti i wsp., 2011; Sala i wsp., 2009; Zhang i wsp., 2014). W mysim modelu raka stercza TRAMP (*transgenic adenocarcinoma mouse prostate*) wykazano zahamowanie formowania się guza pod wpływem działania izotiocyjanianu fenetylu (PEITC), który indukuje programowaną śmierć komórki zależną od autofagii z towarzyszącym obniżeniem poziomu CLU. Dodatkowo wykazano, że CLU może pełnić funkcję biomarkera supresji nowotworowej w osoczu myszy TRAMP traktowanych PEITC (Powolny i wsp., 2011). Ostatnie doniesienia wskazują również na rolę CLU w indukowaniu autofagii ze skutkiem ochronnym przed odpowiedzią na terapię przeciwnowotworową w komórkowym oraz mysim modelu raka stercza (Zhang i wsp., 2014). Podwyższony poziom CLU był obserwowany po zastosowaniu stymulatorów autofagii (inhibitorów proteasomu, oraz kinaz mTOR i Akt), dodatkowo CLU kolokalizowała z białkiem MAP LC3 w błonie autofagosomów, promując konwersję MAP LC3-I do MAP LC3-II i przyczyniając się tym samym do biogenezy autofagosomów oraz indukcji autofagii. Ponadto wyciszenie genu *Clu* skutkowało zahamowaniem autofagii i zwiększeniem wrażliwości komórek na stosowane terapie przeciwnowotworowe (Zhang i wsp., 2014). Podczas stresu ER CLU może pełnić rolę białka opiekuńczego zarówno wewnątrz jak i zewnątrzkomórkowego. Wyatt i wsp., (2011) wykazali zdolność CLU do formowania kompleksów z wadliwie uformowanymi białkami w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*, następnie kompleksy te były kierowane do degradacji lizosomalnej. Dodatkowo Balantinou i wsp., (2009) ujawnili, że CLU może być degradowana zarówno przez system proteasomalny jak lizosomalny.

## 2.8 Wpływ werapamilu na indukcję autofagii

Werapamil (2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5-[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethylmethylamino]-2-propan-2-ylpentanenitrile) jest związkiem chemicznym należącym do grupy fenyloalkiloamin (Ryc. 6). Werapamil jest powszechnie znanym lekiem stosowanym



**Ryc. 6**

Struktura chemiczna werapamilu. (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

przede wszystkim w chorobach sercowo-naczyniowych. Jako inhibitor napięciowo-zależnych kanałów wapniowych typu L ogranicza napływ jonów  $\text{Ca}^{2+}$  do komórki, co powoduje zmniejszenie przewodnictwa impulsów przez węzeł przedsionkowo-komorowy i chroni przed arytmia, ale wpływa również na zmniejszenie napięcia mięśni gładkich naczyń krwionośnych, prowadząc do rozszerzenia ich światła co znalazło zastosowanie w leczeniu nadciśnienia tętniczego i w chorobie niedokrwiennej serca (MedlinePlus, 2015). Inną właściwością werapamilu z perspektywą zastosowania farmakologicznego w cukrzycy jest odkryta niedawno zdolność tej substancji do blokowania białka TXNIP (*thioredoxin-interacting protein*), które przypuszczalnie odpowiedzialne jest za destrukcję komórek  $\beta$  trzustki produkujących insulinę. Chroniąc komórki  $\beta$  trzustki przed zniszczeniem, werapamil może znaleźć zastosowanie w zapobieganiu cukrzycy typu 1 (Abais i wsp., 2014). Działanie werapamilu nie jest jednak związane wyłącznie z zaburzeniami gospodarki  $\text{Ca}^{2+}$  ale może zachodzić na drodze przełamania oporności wielolekowej (*Multidrug Resistance*, MDR) bądź zmniejszonego pobierania glukozy przez komórki (Ardizzone i wsp., 2002, Pingsheng i wsp., 2012,

Trompier i wsp., 2004). W badaniach na komórkach nowotworowych, werapamil jest często wykorzystywany jako bloker pomp białkowych np. glikoproteiny-P, odpowiedzialnych za mechanizm MDR (Ahn i wsp., 2012). Alternatywnym mechanizmem działania werapamilu na komórki nowotworowe jest także jego zdolność do upośledzania dokomórkowego transportu glukozy i związane z tym hamowanie efektu Warburga (Louters L. i wsp., 2010).

Doniesienia z ostatnich lat wskazują również na udział werapamilu w regulacji procesu autofagii (Pająk i wsp., 2012). Zaburzenia autofagii mogą stanowić podłoże wielu chorób m.in. chorób przebiegających ze spichrzaniem w lizosomach (*lysosomal storage diseases*) (Lim i wsp., 2015), otyłości (Park i wsp., 2014), chorób neurodegeneracyjnych (Nixon, 2013) czy nowotworów (Macintosh i Ryan, 2013). Park i wsp., 2014 wykazał, iż chroniczne gromadzenie jonów  $Ca^{2+}$  w hepatocytach myszy z otyłością prowadzi do zahamowania autofagii na etapie połączenia autofagosomów z lizosomami. Zastosowanie werapamilu przywróciło w hepatocytach lizosomalną degradację nagromadzonych białek i tłuszczów, co zapobiegało dalszej reakcji zapalnej i rozwinięciu się insulinooporności. Z kolei w transformowanych nowotworowo mysich fibroblastach NIH 3T3 zastosowanie werapamilu spotęgowało autofagię oraz apoptozę wywołaną działaniem inhibitora kinazy B-Raf – U1-152 (Ahn i wsp., 2012).



### 3. Cel pracy

Celem pracy było poznanie molekularnego mechanizmu indukowanej werapamilem autofagii w komórkach gruczolakoraka okrężnicy linii COLO 205 oraz raka stercza PC-3 a także porównanie działania werapamilu w normalnych komórkach nabłonkowych stercza linii PNT-2. Do szczegółowych zadań badawczych należało:

1. Wykazanie w jakim stopniu indukowana werapamilem autofagia zachodzi w badanych liniach komórkowych.
2. Rozstrzygnięcie czy autofagia indukowana pod wpływem werapamilu zachodzi wskutek:
  - (a) zaburzeń gospodarki wapniowej,
  - (b) upośledzenia dostępu do glukozy,
  - (c) odpowiedzi na stres siateczki śródplazmatycznej.
3. Ustalenie zależności pomiędzy autofagią a programowaną śmiercią komórki poddanej działaniu werapamilu.

#### 4. Materiały i metody

##### 4.1 Linie komórkowe wykorzystane w doświadczeniach

W badaniach wykorzystano komórki gruczolakoraka okrężnicy linii COLO 205, raka stercza linii PC-3 oraz prawidłowe komórki nabłonkowe stercza linii PNT-2. Linie komórek nowotworowych wybrane do badań cechuje złośliwość oraz wysoka oporność na chemioterapeutyki i naturalne ligandy receptorów śmierci.

Komórki COLO 205 zostały zakupione z American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Linia COLO 205 to nabłonkowe komórki ludzkiego gruczolakoraka okrężnicy należące do klasy D nowotworów jelita grubego (wg. klasyfikacji Duke'a). Linię wyizolowano w 1975 roku z komórek przerzutowych pochodzących z płynu puchlinowego 70 letniego mężczyzny rasy kaukaskiej, chorego na gruczolakoraka okrężnicy. Komórki COLO 205 posiadają homozygotyczne mutacje w genach *APC*, *b-RAF*, *SMAD4* i *tp53*, ponadto wszczepione do myszy pozbawionych systemu immunologicznego (myszy bezgrasicze, *nude mice*) powodują rozwój nowotworu (ATCC, 2015).

Komórki linii PC-3 zostały zakupione z American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Linię PC-3 wyizolowano w 1979 roku z komórek przerzutowych nabłonka raka stercza znajdujących się w układzie kostnym 62 letniego mężczyzny rasy kaukaskiej. Komórki PC-3 mają homozygotyczne mutacje w genach *PTEN* oraz *TP53*, cechują się wysokim potencjałem metastatycznym i należą do IV klasy złośliwości nowotworów stercza (ATCC, 2015). Ponadto komórki PC-3 są niewrażliwe na androgeny, glikokortykosteroidy czy nabłonkowy czynnik wzrostu (Kaighn i wsp., 1979). Wykorzystywane są zarówno w badaniach *in vitro* jak również *in vivo* gdyż są zdolne do formowania guza u myszy bezgrasiczych.

Jako linię referencyjną wybrano nietransformowane nowotworowo, immortalizowane wirusem SV40, komórki nabłonkowe stercza PNT-2. Linia komórkowa została wyizolowana z nabłonka stercza 33 letniego mężczyzny i zakupiono ją w European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, Wlk. Brytania). Komórki PNT-2 nie są zdolne do formowania nowotworów u myszy bezgrasiczych.

Wszystkie linie były hodowane w sterylnych butelkach i przechowywane w standardowych dla kultur *in vitro* warunkach (5% wysycenia powietrza CO<sub>2</sub>, 95%

wilgotności, temperatura 37°C) w inkubatorze Sanyo MCO-17-AIC (Sanyo Electronic Biomedical Co., Ltd., Moriguchi, Japonia). Komórki linii COLO 205 oraz PC-3 były hodowane w pożywce wzrostowej zawierającej: DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, CytoGen, Łódź, Polska), glukozę (1 g/l), glutamax, pirogronian sodu, czerwień fenolową, 10% (v/v) surowicę bydlęcą (*Fetal Bovine Serum*, FBS, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), oraz antybiotyki: roztwór wodny penicyliny i streptomycyny – (pen/strep 50 IU/ml/50 µg/ml), siarczan gentamycyny (20 µg/ml), fungizone – amfoterycyna B (1 µg/ml) (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Komórki PNT-2 hodowano w pożywce wzrostowej zawierającej RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*), glukozę (1 g/l), glutamax, pirogronian sodu, czerwień fenolową, 10% (o/o) FBS oraz wymienione wyżej antybiotyki. Surowica bydlęca dodawana do pożywek była uprzednio inaktywowana przez 30 min. w łaźni wodnej w temperaturze 56°C. Pożywka wzrostowa była wymieniana co 48 godz., za każdym razem przed wymianą pożywki pojedyncza warstwa komórek przepłukiwana była roztworem fizjologicznym buforowanym fosforanami (*Phosphate-Buffered Saline*, PBS, Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA) z dodatkiem jonów wapnia. Wszystkie stosowane pożywki oraz bufony były sterylizowane przy użyciu podciśnieniowych filtrów butelkowych o średnicy porów 22 µm (Costar Corning Corporation, Cambridge, MA, USA) a następnie przechowywane w temperaturze 4°C i przed użyciem ogrzewane w łaźni wodnej do temp. 37°C (GFL Typ 1002, Burgwedel, Niemcy).

#### 4.2 Sprzęt do hodowli, plastiki laboratoryjne

Komórki były hodowane w sterylnych, plastikowych butelkach o pojemności 75 cm<sup>3</sup> z antybakteryjnym filtrem korkowym (Costar Corning Corporation, Cambridge, MA, USA) oraz w zależności od typu doświadczenia, w sterylnych szalkach Petriego (śr. 35 mm, 100 mm) lub w płaskodennych płytkach 96-dołkowych lub 6-dołkowych (płytki wielodołkowe, Becton Dickinson, BD Biosciences, Franklin Lakes, NY, USA). Wszystkie czynności wykonywano w komorze laminarnej z pionowym przepływem powietrza, sterylizowanej lampą UV (7BZ-HF-1200-001, Heal Force, Szanghaj, ChRL) przy użyciu sterylnych pipet serologicznych (1 – 25 ml) oraz probówek stożkowych (15 ml, 50 ml) zakupionych w BD Biosciences (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NY, USA).

#### 4.3 Metody pracy z hodowlą komórkową (mrożenie i odzyskiwanie komórek, przygotowanie komórek do doświadczeń)

Komórki w stanie subkonfluentnym odklejano od dna butelki przy użyciu roztworu trypsyny zawierającego 1 mM EDTA (0,25% (w/o) trypsyna-EDTA, Gibco Life Technologies Grand Island, NY, USA). Komórki poddawano działaniu trypsyny przez ok. 2-3 min. w temperaturze 37°C, następnie trypsyna była neutralizowana przez przeniesienie zawiesiny komórek do pożywki wzrostowej. Komórki odzyskiwano przez odwirowanie przez 5 minut (200 g) (TJ-6 Centrifuge, Beckman Instruments Incorporation, Palo Alto, CA, USA). Po usunięciu supernatantu komórki zawieszano ponownie w pożywce wzrostowej, zawierającej 10% (o/o) dimetylosulfotlenku (DMSO) oraz umieszczano w probówkach przeznaczonych do głębokiego mrożenia (Nunc Incorporation, Naperville, IL, USA). Podczas zamrażania komórek temperaturę obniżano stopniowo o 1°C/min przez umieszczenie probówek w plastikowym naczyniu (CryoBox, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) z podwójną ścianą (wolna przestrzeń wypełniona jest izopropanolem). Pojemnik przechowywano przez 24 godz. w temperaturze -80°C, następnie probówki z komórkami umieszczano w pojemniku z ciekłym azotem typu dewar (temp. -196°C). Po rozmrożeniu i przeniesieniu do probówki stożkowej typu eppendorf komórki wirowano (200 g, 5 min, temp. 20°C, Microcentrifuge G-1098, Chiny) w celu usunięcia DMSO, a następnie po odessaniu supernatantu, przepłukaniu PBS i ponownym odwirowaniu hodowano w pożywce wzrostowej w sterylnych butelkach, w warunkach standardowych dla hodowli *in vitro* (temp. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% wilgotności) do uzyskania subkonfluencji. Uzyskaną pojedynczą warstwę komórek „trypsynizowano” a komórki wysiewano w zależności od rodzaju doświadczenia na sterylne płytki lub szalki. Po 24 godz. w pożywce wzrostowej adherentne komórki przepłukiwano PBS i na kolejne 24 godz. wymieniano pożywkę wzrostową na kontrolną wolną od surowicy (2% (w/o) BSA zamiast FBS) w celu wymuszenia zakończenia podziałów komórkowych. Tak przygotowane komórki były poddawane działaniu czynników doświadczalnych przez 6-48 godz. w zależności od rodzaju doświadczenia.

#### 4.4 Doświadczenia wykonane na hodowlach komórkowych w płytkach wielodołkowych – testy metaboliczne

Wykorzystywane w doświadczeniach odczynniki były przygotowywane w postaci 1000-krotnie zatężonych roztworów wodnych lub w DMSO lub w etanolu, zgodnie

z zaleceniami producentów. W przypadkach, gdy zastosowano czynnik rozpuszczony w DMSO lub w etanolu, pożywka dla warunków kontrolnych zawierała 0,1% (o/o) rozpuszczalnika. Pożywki doświadczalne były przygotowywane w sterylnych warunkach przez dodanie czynników doświadczalnych do pożywki kontrolnej. W badaniach wykorzystano następujące czynniki doświadczalne w stężeniach ustalonych na podstawie danych literaturowych i badań własnych zakupione w Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA: werapamil (chlorek werapamilu), nifedypina, chlorek wapnia, D-glukoza, floretyna.

#### 4.4.1 Pomiar przeżywalności komórek – test MTT

Pomiar przeżywalności komórek pod wpływem badanych czynników doświadczalnych przeprowadzono z wykorzystaniem testu MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*, Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Jest to test kolorymetryczny, bazujący na ocenie aktywności zależnych od NAD(P)H enzymów mitochondrialnych, które przekształcają rozpuszczalny w wodzie MTT o żółtej barwie w nierozpuszczalny w wodzie fioletowy formazan (*(E,Z)-5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan*). Roztwór MTT (5 mg/ml) był przygotowywany w pożywce DMEM bez czerwieni fenolowej, a następnie filtrowany przy pomocy celulozowych filtrów strzykawkowych (0,22  $\mu\text{m}$ , Costar Corning Corporation, Cambridge, MA, USA) i przechowywany w 4°C. Test przeprowadzano na komórkach rosnących w 96-dołkowej przezroczystej, płaskodennej, sterylnej wielopłytkce, w objętości 100  $\mu\text{l}$  pożywki/dołek. Na ostatnią godzinę przed zakończeniem doświadczenia (dotyczy czasu przeznaczanego na działanie badanych czynników doświadczalnych), usuwano pożywkę z dołek przy pomocy pipety wielokanałowej i do zagłębień dodawano 50  $\mu\text{l}$  ogrzanego w łaźni wodnej roztworu MTT. Płytkę umieszczano na 1 godz. w cieplarni (temp. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% wilgotności) a po upływie czasu inkubacji usuwano roztwór MTT a osad formazanu rozpuszczano w 50  $\mu\text{l}$  DMSO. Pomiar absorbancji wykonywano dla długości fali  $\lambda=570$  nm, przy użyciu czytnika Infinite® M1000 (TECAN Mannedorf, Szwajcaria). Przedstawiona na wykresach przeżywalność komórek jest wprost proporcjonalna do absorbancji formazanu. Wyniki przedstawiono jako procent absorbancji w układzie kontrolnym (brak traktowań) w czasie T=0.

## 4.4.2 Pomiar proliferacji komórek – test z fioletem krystalicznym

Proliferację komórek pod wpływem badanych czynników doświadczalnych oznaczono przy użyciu fioletu krystalicznego (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) barwiącego DNA komórek. Badanie przeprowadzono na komórkach rosnących w 96-dołkowej przezroczystej, płaskodennej, sterylnej płytce, w objętości 100  $\mu$ l pożywki/zagłębienie. Po zakończeniu doświadczenia (dotyczy czasu przeznaczanego na działanie badanych czynników doświadczalnych) usuwano pożywkę z dołków przy pomocy pipety wielokanałowej. Komórki płukano PBS a następnie utrwalano w 75% metanolu w 4°C przez 20 min. i przez kolejne 20 min. w 100% metanolu w 4°C (50  $\mu$ l/zagłębienie). W dalszej kolejności metanol zastępowano 0,2% (w/o) wodnym roztworem fioletu krystalicznego (50  $\mu$ l/zagłębienie) a płytkę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 20 min. Następnie delikatnie usuwano niezwiązany z DNA komórek roztwór fioletu krystalicznego przez stopniowe zanurzanie płytki w wodzie. Po osuszeniu płytki, osad rozpuszczano w DMSO i wykonywano pomiar absorbancji dla długości fali  $\lambda=590$  nm, przy użyciu czytnika Infinite® M1000 (TECAN Mannedorf, Szwajcaria). Przedstawiona na wykresach proliferacja komórek jest wprost proporcjonalna do absorbancji fioletu krystalicznego związanego z DNA komórek. Wyniki przedstawiono jako procent absorbancji w układzie kontrolnym (brak traktowań) w czasie  $T=0$ .

## 4.4.3 Pomiar stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie – fluorescencja FURA-2-AM

Stężenie wolnych jonów  $Ca^{2+}$  w cytoplazmie komórek pod wpływem badanych czynników doświadczalnych oceniono na podstawie fluorescencji FURA-2-AM (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). FURA-2-AM jest estrem barwnika FURA-2, który po przeniknięciu błony komórkowej ulega deestryfikacji i zatrzymaniu we wnętrzu komórek, gdzie wiąże jony  $Ca^{2+}$ . FURA-2 emituje fluorescencję przy długości fali wzbudzenia  $\lambda=340$  nm (kompleksy z wapniem) oraz  $\lambda=380$  nm (FURA-2 niezwiązana z wapniem). Emisja fluorescencji mierzona jest przy długości fali  $\lambda=510$  nm. Stosunek fluorescencji wyemitowanych po wzbudzeniu falami o długości 340/380 nm wyznacza stężenie wewnątrzkomórkowej puli jonów wapnia. Komórki były hodowane na płaskodennych, sterylnych płytkach 96-dołkowych typu „chimney” (z przezroczystym dnem i czarnymi ściankami, Becton Dickinson, BD Biosciences, Franklin Lakes, NY, USA), w objętości 100  $\mu$ l pożywki/zagłębienie. Po usunięciu pożywki przy pomocy pipety wielokanałowej,

komórki były płukane roztworem HBSS o pH 7,4 (*Hank's Balanced Salt Solution*, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Roztwór FURA-2-AM w DMSO (1 mM) mieszano w stosunku objętościowym 1:1 z odczynnikiem Pluronic® F-127 (20% roztwór w DMSO, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), który służył do zatrzymania FURA 2-AM wewnątrz komórek. Następnie roztwór dodawano do roztworu HBSS wzbogaconego w jony wapnia oraz środki utrzymujące FURA-2-AM we wnętrzu komórek 2,5% (w/o) BSA i 2,5 mM probenecid (roztwór wodny, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), do uzyskania końcowego stężenia FURA-2-AM równego 4 μM. Tak przygotowany roztwór FURA-2-AM był dodawany do pożywki na 30 min. inkubacji w ciemności w temperaturze pokojowej. W dalszej kolejności komórki były płukane 3-krotnie roztworem HBSS i pozostawiano je na 30 min. w ogrzonym w 37°C HBSS, co umożliwiała deestryfikację barwnika przez esterazy wewnątrzkomórkowe do formy wewnątrzkomórkowej. Po okresie inkubacji bufor HBSS był wymieniany na świeży. W próbach przeznaczonych do odczytu minimalnej fluorescencji FURA-2 ( $F_{\min}$ ) roztwór HBSS (bez jonów wapnia) zawierał dodatkowo 4 mM EDTA, a w próbach przeznaczonych do odczytu maksymalnej fluorescencji FURA-2 ( $F_{\max}$ ) – 5 mM jonomycyny. Pomiar fluorescencji FURA-2 był wykonywany przy pomocy czytnika Infinite® M1000 (TECAN Mannedorf, Szwajcaria) w temperaturze 37°C, dla długości fali wzbudzenia  $\lambda=340$  nm i fali emisji  $\lambda=510$  nm oraz dla fali wzbudzenia  $\lambda=380$  nm i fali emisji  $\lambda=510$  nm. Stężenie wolnych jonów wapnia zostało wyliczone na podstawie wzoru:

$$[\text{Ca}^{2+}]_c = Kd (F - F_{\min}) / (F_{\max} - F) \quad (\text{Bhattacharya and Chakrabarti, 1998})$$

Gdzie:

$[\text{Ca}^{2+}]_c$  – stężenie wolnych jonów wapnia w cytoplazmie komórek

Kd – stała wiązania jonów  $\text{Ca}^{2+}$  przez FURA-2 w temperaturze 37°C równa 224

F – stosunek fluorescencji FURA-2 340 nm/380 nm odczytanej przy  $\lambda=510$  nm

$F_{\max}$  – stosunek fluorescencji FURA-2 340 nm/380 nm odczytanej przy  $\lambda=510$  nm w próbach zawierających jonomycynę

$F_{\min}$  – stosunek fluorescencji FURA-2 340 nm/380 nm odczytanej przy  $\lambda=510$  nm w próbach zawierających EDTA

### 4.5 Pomiar natężenia programowanej śmierci komórki w cytometrze przepływowym na podstawie odsetka komórek zawierających frakcję „subG<sub>1</sub>” DNA.

Do analizy indukcji programowanej śmierci komórki przy pomocy cytometru przepływowego wykorzystano pomiar zawartości pofragmentowanego DNA zlokalizowanego na histogramie cyklu komórkowego jako pik „subG<sub>1</sub>”. W doświadczeniach wykorzystano werapamil oraz inhibitory metaboliczne zakupione w Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA: chlorochinę, Z-VAD. Komórki hodowano na płytkach 6-dołkowych (Becton Dickinson, BD Biosciences, Franklin Lakes, NY, USA). Po zakończeniu doświadczenia komórki odklejano przy użyciu trypsyny i zbierano wraz z medium do probówek przeznaczonych do cytometrii przepływowej (Becton Dickinson, BD Biosciences, Franklin Lakes, NY, USA). Po odwirowaniu (200 g, 5 min, wirówka Allegra X-12, Beckman Coulter Inc, Pasadena, CA, USA) usuwano supernatant a osad komórek zawieszano w PBS. Następnie do zawiesiny komórek dodawano 2 ml zimnego (-20°C) metanolu i natychmiast mieszano całość przez kilka sekund przy pomocy wytrząsarki typu „vortex”. Po dwugodzinnym utrwaleniu preparatów w metanolu w 4°C, probówki ponownie wirowano (200 g, 5 min) i usuwano metanol. Osad komórek zawieszano w 400 µl PBS z dodatkiem 4 µl wodnego roztworu jodku propidyny (PI, 5 mg/ml) (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) barwiącego DNA oraz 0,2 µl RNAzy A (100 mg/ml) (Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) w celu wyeliminowania fałszywie pozytywnych wyników uzyskanych z barwienia RNA przez PI. Po pół godzinnej inkubacji w ciemności próbki analizowano przy pomocy cytometru przepływowego (FACS Calibur, Becton Dickinson, BD Biosciences, Franklin Lakes, NY, USA) mierząc fluorescencję PI. Z każdej próbki wykonywano pomiar dla 5000 pojedynczych komórek, odizolowując ich populację od „dubletów” połączonych komórek.

### 4.6 Pomiar względnego poziomu białek – Western blot

#### 4.6.1 Izolacja białek z lizatów całokomórkowych

Komórki były hodowane w 10 cm szalkach Petriego (Becton Dickinson, BD Biosciences, Franklin Lakes, NY, USA). W doświadczeniach wykorzystano werapamil oraz inhibitory metaboliczne zakupione w Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA: chlorochinę, E64d, pepstatynę A. Po zakończeniu doświadczenia zbierano pożywkę zawierającą komórki rosnące w zawiesinie oraz komórki przylegające do podłoża (wykorzystywane w badaniach linii komórek nowotworowych mają zdolność do wzrostu



na podłożu oraz w zawieszynie). Komórki adherentne zbierano przy użyciu skrobaków (Nunc Incorporation, Naperville, IL, USA), dodając 0,5 ml zimnego PBS (czynności wykonywano na kruszonym lodzie). Zawiesinę komórek wirowano w probówkach stożkowych typu eppendorf przez 5 minut (8000 g, 4° C, 5 min, Heal Force High Speer Refrigerated Bench-top Centrifuge Model Neofuge 13R, ChRL), supernatant usuwano przez aspirację, a osad komórek ponownie zawieszano w 0,5 ml zimnego PBS i ponownie wirowano przez 5 minut (8000 g, 4° C, 5 min). Po kolejnym usunięciu supernatantu osad natychmiast zamrażano w -80°C (Ultralow Temperature Frezer, model MDF-U3286S, Sanyo, Japonia) aż do zebrania wszystkich prób z danego eksperymentu. W celu izolacji białek zebrane osady komórek zawieszano w 400 µl buforu RIPA (1x PBS, 10 ml/l Igepal CA-630, 5 g/l dezoksyholan sodu, 1 g/l SDS) z dodatkiem 0.4 mM PMSF, 10 µg/ml aprotyniny i 10 µg/ml ortowanadanu sodu. Przy pomocy strzykawki z igłą (21G, 0,8 mm) materiał homogenizowano. Komórki lizowano przez 30 min. na lodzie, a następnie materiał wirowano przez 5 min w 4°C (10000 g). Uzyskany supernatant zawierający wyizolowane białka przechowywano w -80°C.

#### 4.6.2 Oznaczenie stężenia białka z użyciem kumazyny

W celu oznaczenia stężenia białka w lizatach całokomórkowych wykorzystano metodę z kumazyną (Bradford, 1976). Oznaczenia wykonywano w 96-dołkowej, przezroczystej płytce na lodzie. Do 4 µl lizatu dodawano 16 µl wody dejonizowanej i 160 µl wodnego roztworu odczynnika Bradford (1:4) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Absorbancja w badanych próbach była mierzona przy pomocy czytnika Infinite® M1000 (TECAN Mannedorf, Szwajcaria) dla długości fali  $\lambda=595$  nm. Dla wszystkich prób oznaczenia były wykonywane w trzykrotnych powtórzeniach a stężenie białka było wyliczane na podstawie krzywej regresji uzyskanej z pomiaru absorbancji próbek zawierających 0,1-2 µg wodnego roztworu albuminy bydlęcej w buforze RIPA.

#### 4.6.3 Elektroforeza – SDS-PAGE i transfer białek na membranę PVDF

W celu rozdzielania białek zastosowano pionową elektroforezę denaturującą (SDS-PAGE) na 10-12% (o/o) żelu poliakrylamidowym, w zależności od masy cząsteczkowej identyfikowanych białek. Do przygotowania żelu użyto następujących odczynników: 30% (o/o) roztwór wodny akrylamidu/bisakrylamidu, 10% (w/o) roztwór wodny SDS, TEMED (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) oraz nadsiarczan amonu (APS), TRIZMA base (Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Na żel

nakładano uprzednio zdenaturowany (100°C, 4 min) materiał zawsze zawierający równą ilość białka (20 µg lub 30 µg na studzienkę) oraz ¼ objętości buforu Laemmli (dwukrotnie zatężonego). W celu ustalenia molekularnego ciężaru analizowanych białek używano standardu białek (Kaleidoscope Prestained Standard, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Elektroforezę przeprowadzano przy stałym napięciu 100 V przy użyciu aparatu do elektroforezy (Mini PROTEAN Tetra System, Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, USA). W dalszej kolejności wykonywano transfer białek z żelu poliakrylamidowego na membranę nylonową PVDF. Proces przeprowadzano przez 90 min. przy pomocy aparatu do transferu (Trans blot Cell, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) przy napięciu 100 V (zasilacz Power Pac HC, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) w buforze do transferu zawierającym TRIZMA base i glicynę (Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) oraz metanol (Polskie Odczynniki Chemiczne, Gliwice, Polska).

#### 4.6.4 Immunodetekcja białek

Membrany PVDF były blokowane przez 75 min. w buforze TBST (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,5 ml/l Tween20, pH 7,5) zawierającym 5% (w/o) odtłuszczonego mleka w proszku. Następnie membrany inkubowano przez noc w 4°C z przeciwciałami pierwszorzędowymi rozcieńczonymi w buforze TBST zawierającym 5% (w/o) odtłuszczonego mleka w proszku (przeciwciała zakupione w Santa Cruz Biotechnology lub Thermo Fisher Scientific) lub w buforze TBST z dodatkiem 5% (w/o) BSA (przeciwciała zakupione w Cell Signalling Technology). W badaniach wykorzystano następujące przeciwciała pierwszorzędowe:

Przeciwciała zakupione w Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA:

- Kozie poliklonalne przeciwciała IgG anty-Beklina 1
- Kozie poliklonalne przeciwciała IgG anty-klasteryna  $\alpha$
- Kozie poliklonalne przeciwciała IgG anty-aktyna

Przeciwciała zakupione w Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA:

- Królicze poliklonalne przeciwciała IgG anty-GLUT1
- Królicze poliklonalne przeciwciała IgG anty-Vps34

Przeciwciała zakupione w Cell Signalling Technology Inc, Danvers, MA, USA:

- Królicze monoklonalne przeciwciała IgG anty-BiP
- Mysie monoklonalne przeciwciała IgG2a anty-CHOP

## MATERIAŁY I METODY

- Królicze monoklonalne przeciwciała IgG anti-cięta kaspaza 3
- Królicze monoklonalne przeciwciała IgG anti-PARP
- Królicze poliklonalne przeciwciała IgG anti-ERK2
- Królicze poliklonalne przeciwciała IgG anti-Bcl-2
- Królicze poliklonalne przeciwciała IgG anti-LC3B (MAP LC3-I i II)

Po zakończeniu inkubacji z przeciwciałami pierwszorzędowymi, membrany płukano trzykrotnie po 5 min. w buforze TBST a następnie inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej z odpowiednimi gatunkowo przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z peroksydazą chrzanową rozcieńczonymi w buforze TBST z dodatkiem 5% (w/o) odtłuszczonego mleka w proszku.

Wykorzystano następujące przeciwciała drugorzędowe:

- Ośle anti-kozie HRP (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA)
- Ośle anti-królicze HRP (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA)
- Kozie anti-królicze HRP (Cell Signalling Technology Inc, Danvers, MA, USA)
- Końskie anti-mysie HRP (Cell Signalling Technology Inc, Danvers, MA, USA)

Po zakończeniu inkubacji z przeciwciałami wtórnymi, membrany płukano 3 krotnie w buforze TBST a następnie inkubowano przez 1 minutę z odczynnikiem przeznaczonym do chemiluminescencyjnej detekcji białek - Pierce ECL Western blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Klisze fotograficzne (Kodak, Rochester, NY, USA) wywoływano w ciemni używając wywoływacza i utrwalacza firmy Foton (koncentrat wywoływacza Foton WR-1N, koncentrat utrwalacza UR-1N, Warszawa, Polska). Klisze skanowano a uzyskane prążki analizowano densytometrycznie przy pomocy programu GelExpert lub ImageJ. Intensywność prążków reprezentujących identyfikowane białka porównano z intensywnością prążka aktyny lub ERK2 i przedstawiono w formie wykresu reprezentującego średnie z trzech powtórzeń doświadczenia.

## 4.7 Badania przeprowadzone w mikroskopie konfokalnym

## 4.7.1 Uzyskanie stabilnych linii komórek COLO 205 i PC-3 zawierających konstrukt genu białka LC3 połączonego z genem kodującym białko zielonej fluorescencji GFP

W celu wyprowadzenia stabilnych linii COLO 205 i PC-3 wykorzystano system Phoenix-MMULV polegający na dostarczaniu pożądaných genów do komórek ludzkich za pośrednictwem infekcji wektorem retrowirusowym MMULV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) namnażanym w komórkach Phoenix pełniących rolę gospodarza (G. Nolan, Stanford University, Stanford, CA, USA; [http://web.stanford.edu/group/nolan/OldWebsite/retroviral\\_systems/retsys.html](http://web.stanford.edu/group/nolan/OldWebsite/retroviral_systems/retsys.html)). Komórki Phoenix (Phoenix-AMPHO, ATCC, Rockville, MD, USA) hodowano na 10 cm szalkach Petriego (Becton Dickinson, BD Biosciences, Franklin Lakes, NY, USA) i transfekowano plazmidem (wektorem retrowirusowym) pBP-puro zawierającym konstrukt *LC3-GFP* oraz gen oporności na puromycynę oraz kontrolnym plazmidem pBP-puro (plazmidy wykorzystano dzięki uprzejmości prof. Kevina Ryana, Tumour Cell Death Laboratory, Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow, Wlk. Brytania). Transfekcje wykonano przy zastosowaniu metody z wykorzystaniem fosforanu wapnia, który umożliwia wiązanie egzogennej DNA do błony komórkowej i następczą endocytozę materiału. W tym celu DNA do transfekcji rozcieńczono w 440 µl molekularnie czystej wody (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA) oraz w 500 µl dwukrotnie stężonego buforu HBSS pH 6,9 (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA), po czym przeprowadzono inkubację (30 min, 37°C) z 60 µl 2M roztworu CaCl<sub>2</sub>. Każda szalka zawierająca komórki Phoenix była transfekowana 15 µg DNA i inkubowana w 37°C przez noc. W dalszej kolejności komórki COLO 205 i PC-3 były infekowane 3 krotnie (w odstępach czasu co 12 godzin) pożywką pochodzącą z hodowli komórek Phoenix zawierającą namnożone wektory retrowirusowe uprzednio przefiltrowaną przez filtr strzykawkowy o porach 45 µm z dodatkiem 2,5 µl polibrenu (10 mg/ml hexadimethrine bromide, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Po zakończeniu serii infekcji, przeprowadzono dwutygodniową selekcję komórek w pożywce hodowlanej DMEM z dodatkiem puromycyny (1 µg/ml) (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Doświadczenie wykonano w laboratorium hodowli komórkowej kategorii II dostosowanym do pracy z organizmami zakaźnymi (Tumour Cell Death Laboratory, Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow, Wlk. Brytania).

### 4.7.2 Obserwacje lokalizacji białka MAP LC3-I i MAP LC3-II przeprowadzone w mikroskopie konfokalnym

Komórki COLO 205 oraz PC-3 ekspresujące GFP-LC3 hodowano na okrągłych szkiełkach nakrywkowych umieszczonych w szalkach Petriego (Becton Dickinson, BD Biosciences, Franklin Lakes, NY, USA). Po zakończeniu doświadczenia szkiełka z przylegającymi komórkami przepłukiwano buforem PBS a następnie utrwalano przez 15 min w 4% wodnym roztworze paraformaldehydu w temperaturze pokojowej. Następnie komórki ponownie płukano roztworem PBS i wybarwiano jądra roztworem DAPI (Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Obserwacje przeprowadzono przy użyciu mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 710 (Carl Zeiss AG, Jena, Niemcy).

### 4.8 Analiza ultrastruktury w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM)

Komórki hodowano w szalkach Petriego o średnicy 10 cm (Becton Dickinson, BD Biosciences, Franklin Lakes, NY, USA). Po zakończeniu inkubacji z werapamilem zbierano pożywkę zawierającą komórki rosnące w zawiesinie oraz komórki przylegające do podłoża (procedura jak w przypadku pozyskiwania komórek do analizy Western blot, opis w tekście powyżej). Osad komórek utrwalano w 2% (w/o) paraformaldehydzie i 2,5% glutaraldehydzie w 0,1 mM roztworze buforu kakodylanowego przez 2 godziny w 4°C. Następnie komórki płukano w buforze kakodylanowym i utrwalano w 1% (w/o) OsO<sub>4</sub> w 0,1 mM roztworze buforu kakodylanowego przez 1 godzinę. W dalszej kolejności komórki odwadniano we wzrastających stężeniach etanolu i zatapiano w żywicy Epon 812. Zatopiony materiał trzymowano i cięto na ultracienkie skrawki przy użyciu ultramikrotomu (model MTXL, Boeckeler Instruments, Inc., Tucson, Arizona, USA) nożem posiadającym diamentowe ostrze. Skrawki zbierano na miedzianych siatkach a następnie kontrastowano 4,7% octanem uranylu przez 10 min. i odczynnikami Reynoldsa przez 2 min., płucząc obficie strumieniem dejonizowanej wody po każdym barwieniu. Po wysuszeniu siatek ultrastrukturę komórek analizowano przy pomocy mikroskopu elektronowego transmisyjnego JEM 1200 EX (JEOL, Tokyo, Japan) oraz dokumentowano kamerą cyfrową Morada.

### 4.9 Analiza obecności kanałów wapniowych – PATCH-CLAMP

Komórki hodowano na sterylnych szkiełkach nakrywkowych (2x2 cm) umieszczonych w 3 cm szalkach Petriego (Becton Dickinson, BD Biosciences, Franklin

Lakes, NY, USA). Rejestrację prądów przeprowadzono techniką patch-clamp w konfiguracji „whole-cell”. Komórki obserwowano pod mikroskopem świetlnym odwróconym Olympus IX71, (Olympus America Inc, Center Valley, PA, USA) połączonym z kamerą cyfrową Olympus, DP26 (Olympus America Inc, Center Valley, PA, USA). Mikroskop oraz mikromanipulator Sutter Instrument ROE-200 (Sutter Instrument, Novato, CA, USA) umieszczone były na stole antywibracyjnym. Całość osłonięta była ekranizującą siatką miedzianą, pełniącą rolę klatki Faradaya. Szklane mikropipety o oporze 3-4 M $\Omega$  używane jako elektrody przygotowywano w dniu eksperymentu przy pomocy wyciągarki do mikropipet Sutter Instrument P-87 (Sutter Instrument, Novato, CA, USA). Szkiełka z komórkami umieszczano w kamerze (*microscope stage cover slip chamber*, MS5 Scientific Systems Design Inc, Mississauga, Ontario, Kanada). Skład roztworów zewnątrzkomórkowych i wewnątrzkomórkowych zależał od przyjętego protokołu. W doświadczeniach przeprowadzonych w celu zarejestrowania prądów wapniowych kanałów błonowych napięciowo-zależnych skład płynów był następujący:

- roztwór NES (roztwór zewnątrzkomórkowy, obecny w kamerze z komórkami): NaCl (140 mM), KCl (2,8 mM), MgCl<sub>2</sub> (2 mM), CaCl<sub>2</sub> (2 mM), glukoza (10 mM), HEPES (10 mM), pH 7,4 (ustalone przy użyciu TEA OH – *Tetramethylammonium hydroxide*);
- roztwór z glukonianem wapnia (roztwór aplikowany zewnątrzkomórkowo za pomocą perfuzji grawitacyjnej po uzyskaniu konfiguracji „whole-cell”): glukonian wapnia (70 mM), HEPES (30 mM), glukoza (60 mM), osmolarność 280 mOsm/l, pH 7,4 (ustalone przy użyciu TEA OH);
- roztwór wewnątrzkomórkowy obecny w pipecie: CH<sub>3</sub>O<sub>3</sub>SCs (metanosulfonian cezu) (120 mM), CsCl (6 mM), MgCl<sub>2</sub> (2 mM), EGTA (11 mM), HEPES (10 mM), CaCl<sub>2</sub> (1 mM), ATP (4 mM), osmolarność 290 mOsm/l, pH 7,4 (ustalane przy użyciu NMDG – *N-methyl D-glucamine*).

W doświadczeniach zaplanowanych w celu rejestracji prądów napięciowo-niezależnych (liniowych) zastosowano:

- roztwór z CaCl<sub>2</sub> (roztwór zewnątrzkomórkowy, obecny w kamerze z komórkami oraz aplikowany za pomocą perfuzji grawitacyjnej): CaCl<sub>2</sub> (2 mM), chlorek choliny (126 mM), HEPES (10 mM), sacharoza (22 mM), osmolarność 290 mOsm/l, pH 7,4 (ustalane przy użyciu NMDG);

## MATERIAŁY I METODY

- roztwór wolny od jonów  $\text{Ca}^{2+}$  (aplikowany zewnątrzkomórkowo za pomocą perfuzji grawitacyjnej): chlorek choliny (130 mM), HEPES (10 mM), EGTA (0,2 mM), sacharoza (20 mM), osmolarność 290 mOsm/l, pH 7,4 (ustalane przy użyciu NMDG).
- roztwór wewnątrzkomórkowy obecny w pipecie zawierający: CsCl (126 mM),  $\text{MgCl}_2$  (2 mM), EGTA (11 mM), HEPES (10 mM), ATP (4 mM),  $\text{CaCl}_2$  (0,1 mM), osmolarność 290 mOsm/l, pH 7,4 (ustalane przy użyciu NMDG).

Wymiany płynów zewnątrzkomórkowych dokonywano grawitacyjnie poprzez rurkę o małym przekroju (0,7 mm) umieszczaną w pobliżu komórki, dodatkowo kamera z komórkami zaopatrzona była w rurkę zasysającą nadmiar płynów. Płyn wewnątrzkomórkowy przechowywany był w  $4^\circ\text{C}$  i aplikowany przez strzykawkę do napełniania pipet. W celu rejestracji prądów wapniowych pod wpływem werapamilu, roztwór werapamilu aplikowano bezpośrednio do płynu zewnątrzkomórkowego lub do szalki Petriego, w której hodowane były komórki. Przeprowadzając doświadczenie komórki zanurzano w roztworze zewnątrzkomórkowym (NES lub  $\text{CaCl}_2$ , zależnie od protokołu) a następnie zbliżano szklaną elektrodę do wybranej komórki za pomocą mikromanipulatora. Po uzyskaniu konfiguracji „cell-attached” (połączenie pipety z komórką) czekali aż opór pipety osiągnie wartości mierzone w  $\text{G}\Omega$  a następnie uzyskiwano konfigurację „whole-cell” przez przerwanie błony komórkowej. Dalej kompensowano prądy pojemnościowe (wynikające z pojemności elektrycznej komórki mierzonej w pF) oraz opór dostępu (80% kompensacji) i monitorowano wartości: oporu dostępu *SR* (*series resistance*) oraz pojemności komórki *F* (*whole-cell capacitance*). W trakcie rejestracji utrzymywano potencjał spoczynkowy na błonie komórek ( $V_h$ , *holding potential*) równy -100 mV lub 0 mV, po czym wartość potencjału zmieniano skokowo o 10 mV na okres 200 ms co 4 sekundy od wartości -100 mV do 20 mV. Potencjał  $V_h$  modulowano w części eksperymentów, gdy badano jego wpływ na prądy TRP. Prądy filtrowano filtrem 5 kHz i próbkowano z częstotliwością 20 kHz. Protokół P/N (protokół który pozwala na automatyczne odjęcie liniowej składowej rejestrowanych prądów np. prądu upływu, który standardowo stosuje się do rejestracji prądów napięciowo-zależnych, mających charakterystykę odmienną od liniowej) stosowano przy rejestracji prądów z kanałów błonowych napięciowo-zależnych, natomiast podczas rejestracji prądów napięciowo-niezależnych (liniowych) protokołu P/N nie stosowano.

### 4.10 Analiza statystyczna

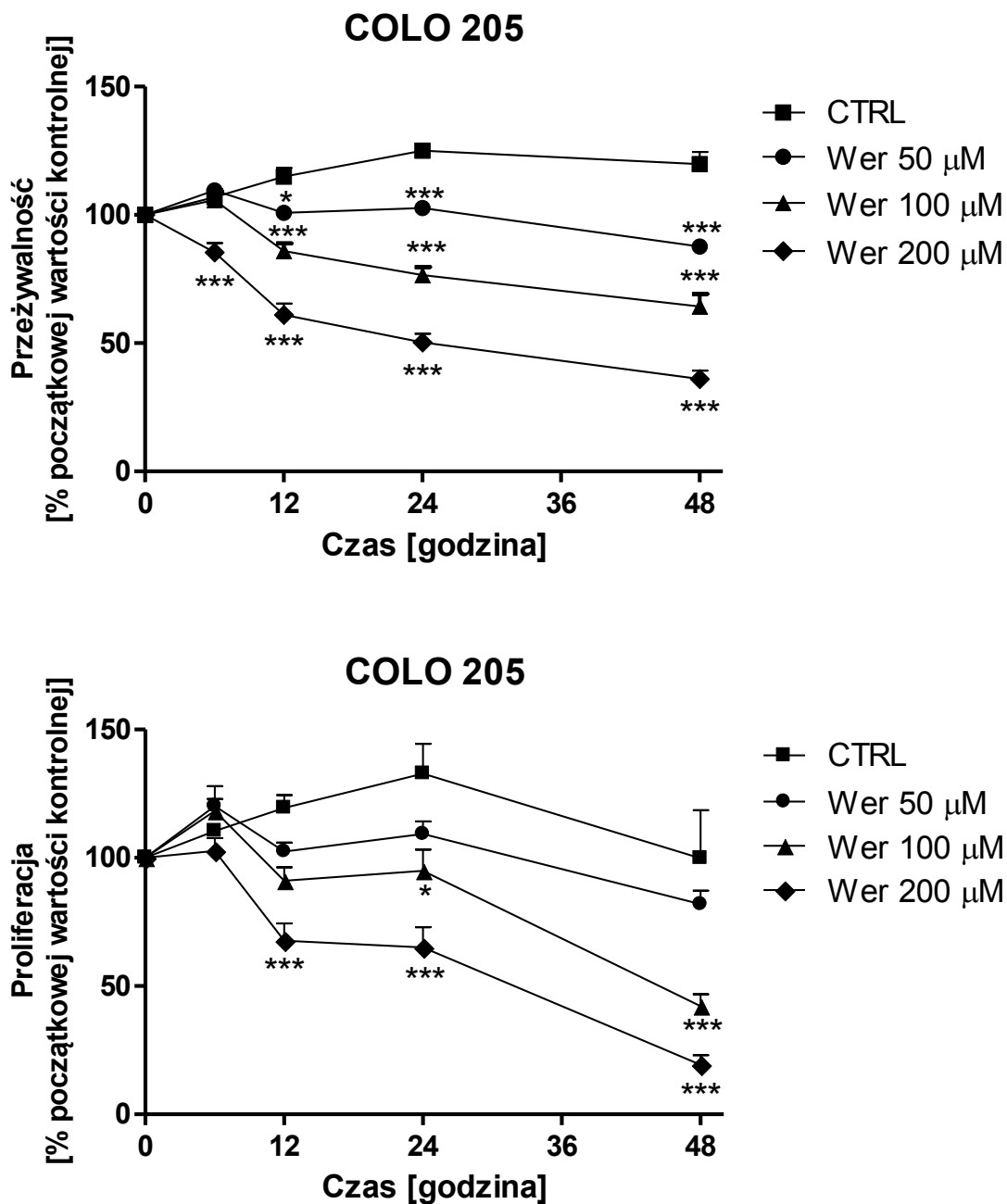
Wyniki otrzymane w poszczególnych doświadczeniach były analizowane statystycznie z użyciem programu GraphPad Prism 5. W analizie wykorzystano dwukierunkową lub jednokierunkową analizę wariancji oraz testy rozstępu Bonferroniego i Tukey'a. Wartości przedstawiają średnie z trzech doświadczeń lub w przypadku testów na wielopłytkach, z trzech doświadczeń wykonanych w minimum czterech powtórzeniach  $\pm$  SEM. Istotne statystycznie różnice oznaczone zostały na poziomach istotności \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  lub, w przypadku większej ilości porównań, także „a”  $P < 0,05$ .



## 5. Wyniki

### 5.1 Wpływ werapamilu na przeżywalność i proliferację komórek COLO 205, PC-3 oraz PNT-2

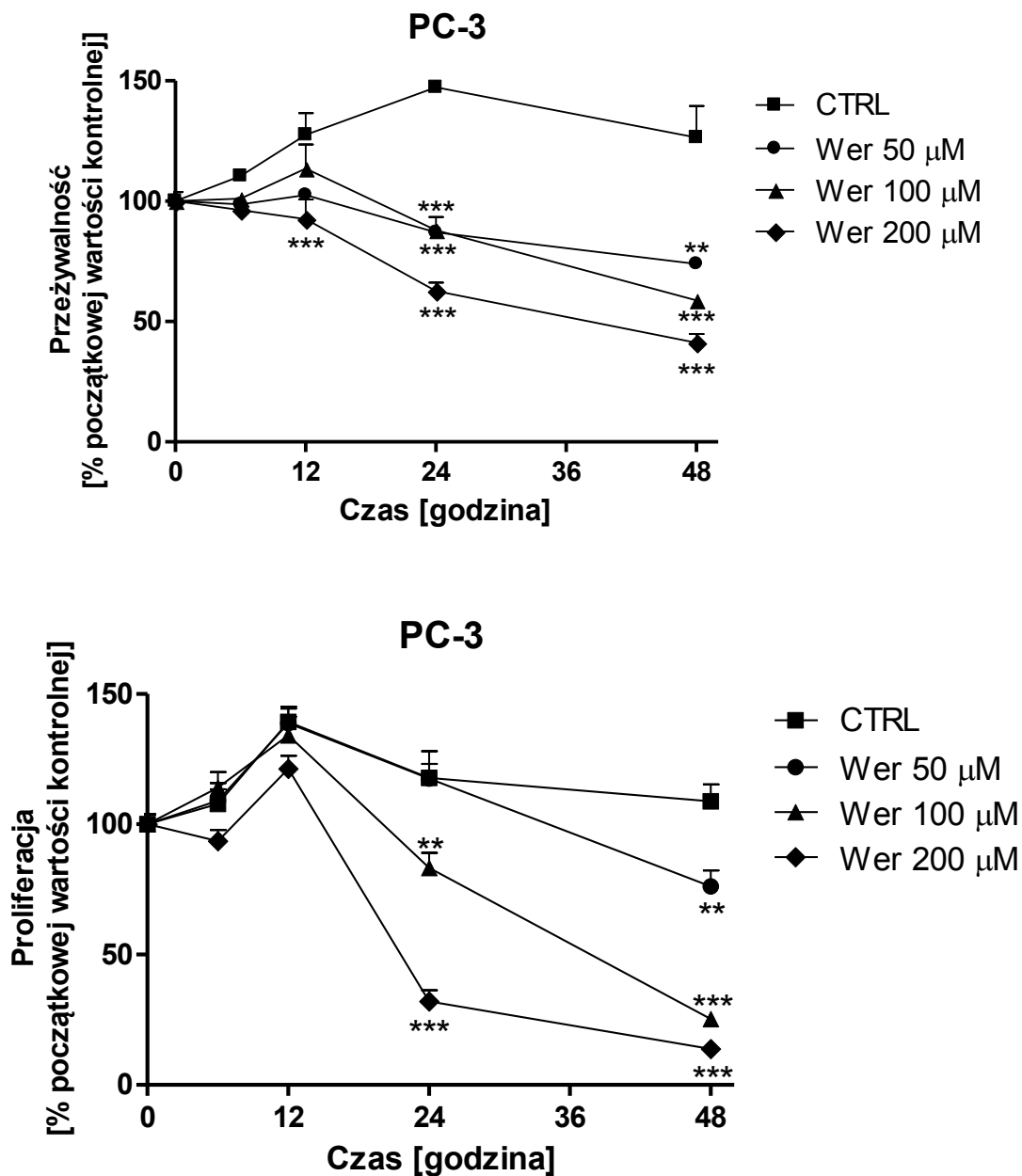
Przeżywalność komórek zmierzona testem MTT i proliferacja oszacowana na podstawie testu z fioletem krystalicznym w komórkach gruczolaka okrężnicy linii COLO 205 oraz raka stercza linii PC-3 obniżyła się pod wpływem werapamilu (50-200  $\mu\text{M}$ ) (Ryc. 7 i 8). Po 48 godzinach działania werapamilu (200  $\mu\text{M}$ ) przeżywalność wyrażona jako odsetek początkowej wartości kontrolnej (komórki nietraktowane werapamilem w czasie  $T=0$ ) wynosiła  $36,12 \pm 3,16\%$  ( $p < 0,001$ ) dla komórek COLO 205 oraz  $41,16 \pm 3,62\%$  ( $p < 0,001$ ) dla komórek PC-3, natomiast proliferacja odpowiednio  $19,36 \pm 3,76\%$  ( $P < 0,01$ ) i  $13,78 \pm 0,55\%$  ( $p < 0,01$ ). W przypadku prawidłowych komórek stercza linii referencyjnej PNT-2, skutki działania werapamilu (200  $\mu\text{M}$ , 48 h) były słabsze a przeżywalność wyrażona jako odsetek początkowej wartości kontrolnej obniżyła się w stopniu umiarkowanym do  $83,32 \pm 5,24\%$  ( $p < 0,001$ ) zaś natężenie proliferacji zmniejszyło się do  $45,90 \pm 1,52\%$  ( $p < 0,01$ ) (Ryc. 9).



Ryc. 7

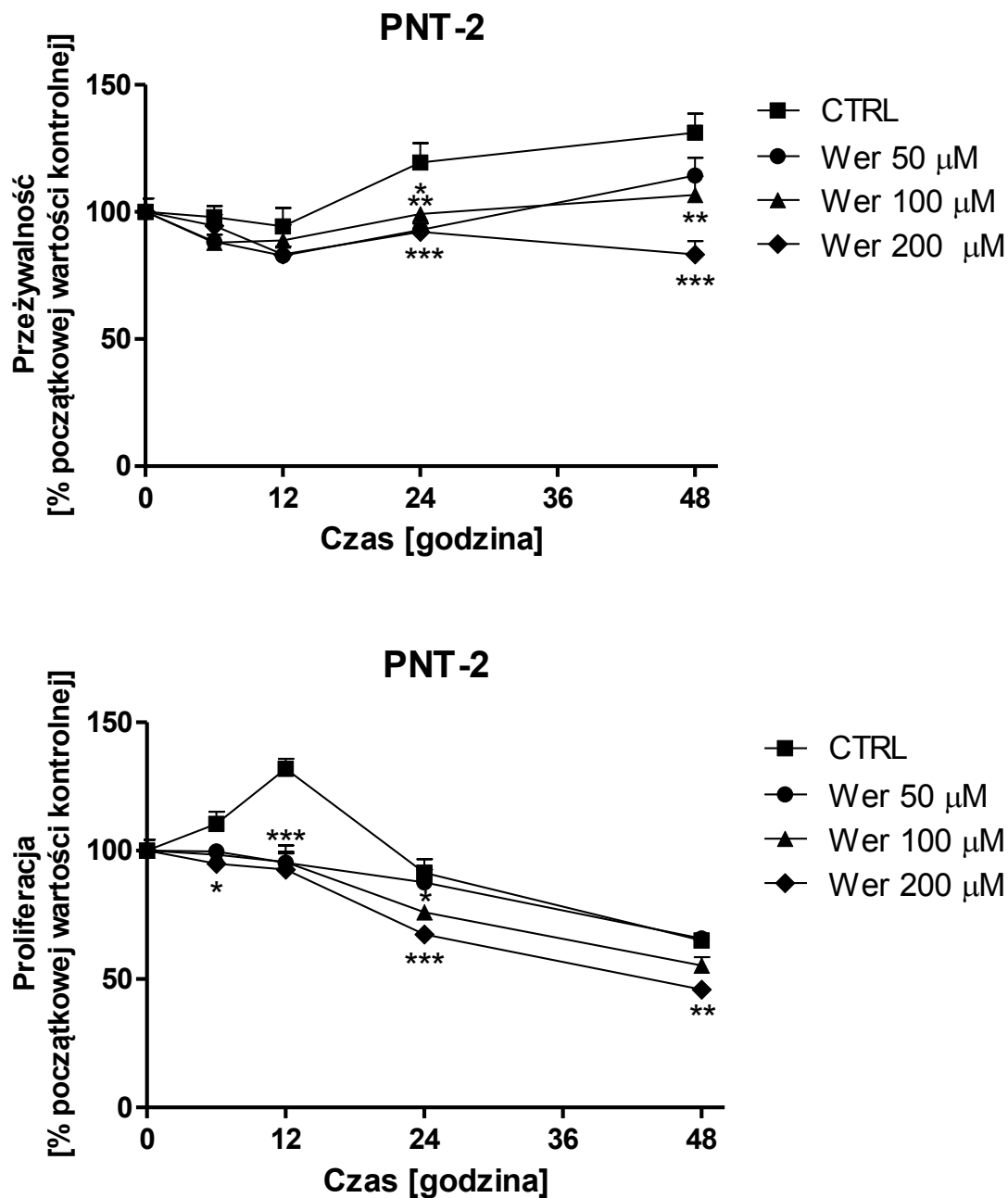
Wpływ wzrastających stężeń inhibitora kanałów wapniowych typu L - werapamilu (50, 100, 200 µM) na przeżywalność (test MTT) oraz proliferację (test z fioletem krystalicznym) komórek linii COLO 205. Punkty oznaczają wartości średnie ( $\pm$  SEM) uzyskane z trzech doświadczeń w czterech powtórzeniach. Gwiazdki oznaczają średnie dla traktowań werapamilu, które różnią się w stopniu statystycznie istotnym (\* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ) od średnich w układzie kontrolnym (CTRL) w odpowiadających sobie punktach pomiaru czasowego (6, 12, 24, 48 godz.).

WYNIKI



Ryc. 8

Wpływ wzrastających stężeń inhibitora kanałów wapniowych typu L - werapamilu (50, 100, 200 μM) na przeżywalność (test MTT) oraz proliferację (test z fioletem krystalicznym) komórek linii PC-3. Punkty oznaczają wartości średnie ( $\pm$  SEM) uzyskane z trzech doświadczeń w czterech powtórzeniach. Gwiazdki oznaczają średnie dla traktowań werapamilu, które różnią się w stopniu statystycznie istotnym (\*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ) od średnich w układzie kontrolnym (CTRL) w odpowiadających sobie punktach pomiaru czasowego (6, 12, 24, 48 godz.).

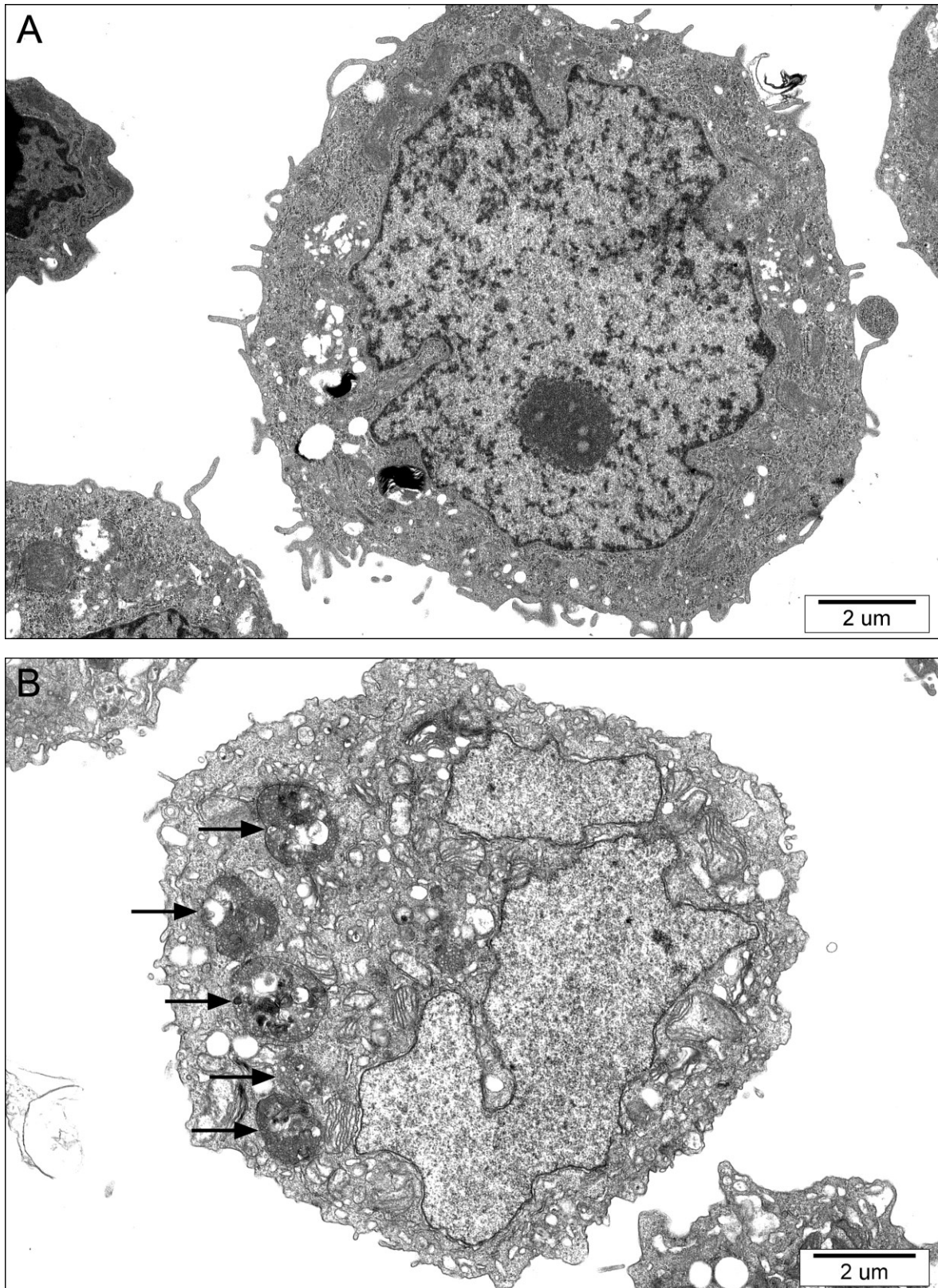


Ryc. 9

Wpływ wzrastających stężeń inhibitora kanałów wapniowych typu L - werapamilu (50, 100, 200  $\mu\text{M}$ ) na przeżywalność (test MTT) oraz proliferację (test z fioletem krystalicznym) komórek linii PNT-2. Punkty oznaczają wartości średnie ( $\pm$  SEM) uzyskane z trzech doświadczeń w czterech powtórzeniach. Gwiazdki oznaczają średnie dla traktowań werapamilu, które różnią się w stopniu statystycznie istotnym (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ) od średnich w układzie kontrolnym (CTRL) w odpowiadających sobie punktach pomiaru czasowego (6, 12, 24, 48 godz.).

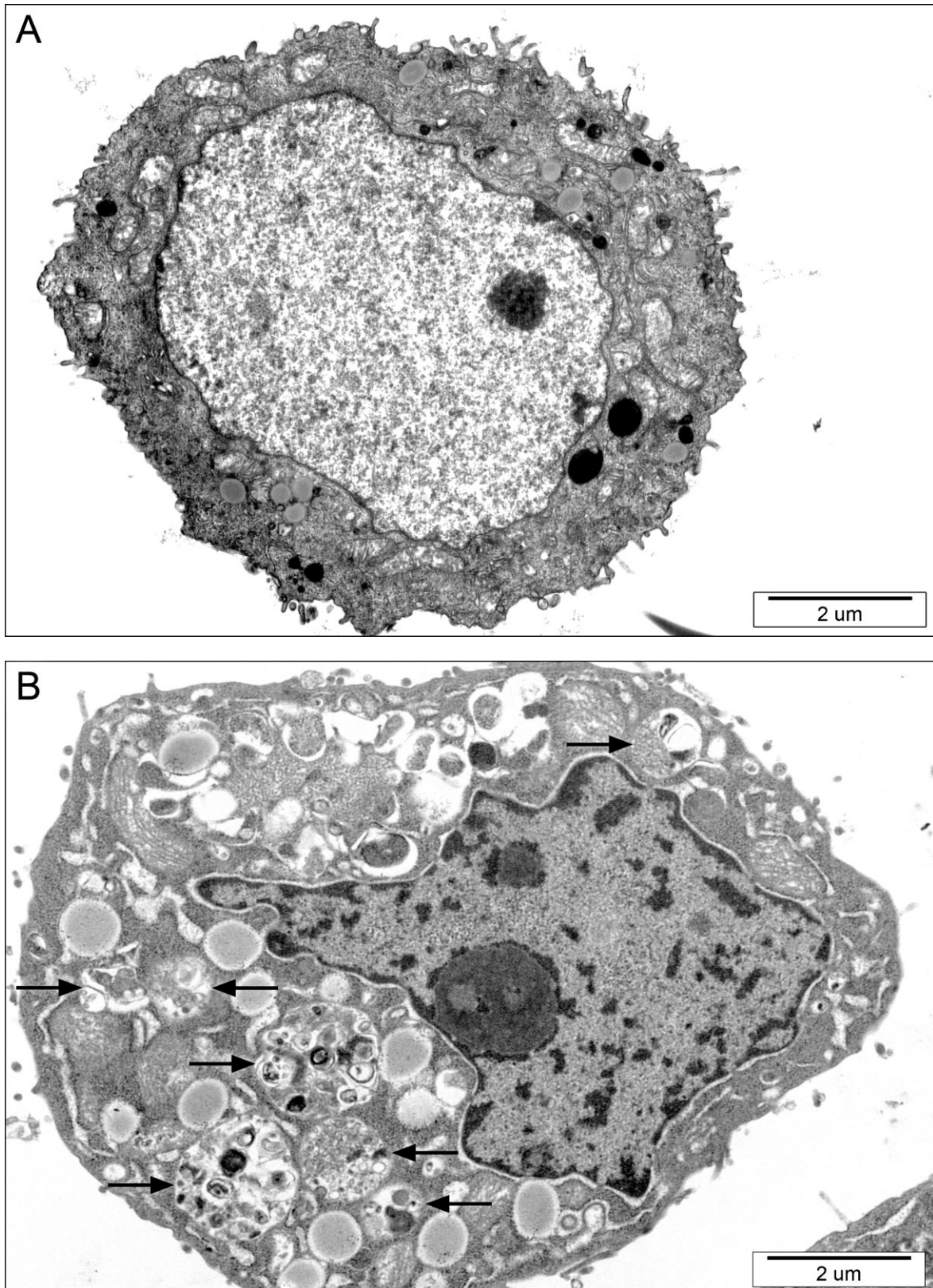
## 5.2 Zmiany w obrazie ultrastrukturalnym komórek COLO 205, PC-3 i PNT-2 pod wpływem działania werapamilu

Obraz ultrastruktury komórek COLO 205 (Ryc. 10) i PC-3 (Ryc. 11) zaobserwowany w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM) po 24 godzinach inkubacji z werapamilem ujawnił w komórkach cechy patologiczne oraz liczne struktury charakterystyczne dla makroautofagii – wakuole autofagowe. W odróżnieniu ultrastruktura komórek PNT-2 (Ryc. 12) po 24 godzinach inkubacji z werapamilem przypominała obraz komórek kontrolnych i charakteryzowała się obecnością nielicznych wakuol autofagowych. Analiza ultrastrukturalna komórek COLO 205 i PC-3 poddanych działaniu werapamilu w różnych czasach inkubacji (6, 12, 24 godz.) pozwoliła na udokumentowanie dynamicznego rozwoju struktur charakterystycznych dla autofagii (Ryc. 13 i 14). W obrazach uzyskanych pod wpływem 6 godzinnej inkubacji z werapamilem dominowały wakuole wczesnoautofagowe, czyli fagofory otaczające wybrane organella i fragmenty cytoplazmy oraz autofagosomy o podwójnej błonie. Z kolei dłuższy czas działania werapamilu sprzyjał przewadze form późnoautofagowych – autofagolizosomów o pojedynczej błonie oraz ciał mielinopodobnych świadczących o selektywnej degradacji lizosomalnej. Wśród obserwowanych struktur wewnątrzkomórkowych, charakterystycznych dla procesu autofagii, w komórkach linii PNT-2 poddanych 24 godzinnej inkubacji z werapamilem przeważały formy wczesnoautofagowe – fagofory i autofagosomy, choć struktury późnoautofagowe tj. autofagolizosomy również były widoczne (Ryc. 15). Ponadto w komórkach COLO 205 i PC-3 traktowanych werapamilem można było zaobserwować poszerzenie kanałów siateczki śródplazmatycznej, co nie było jednak widoczne w komórkach linii PNT-2 poddanych działaniu werapamilu (Ryc. 16, 17, 18).



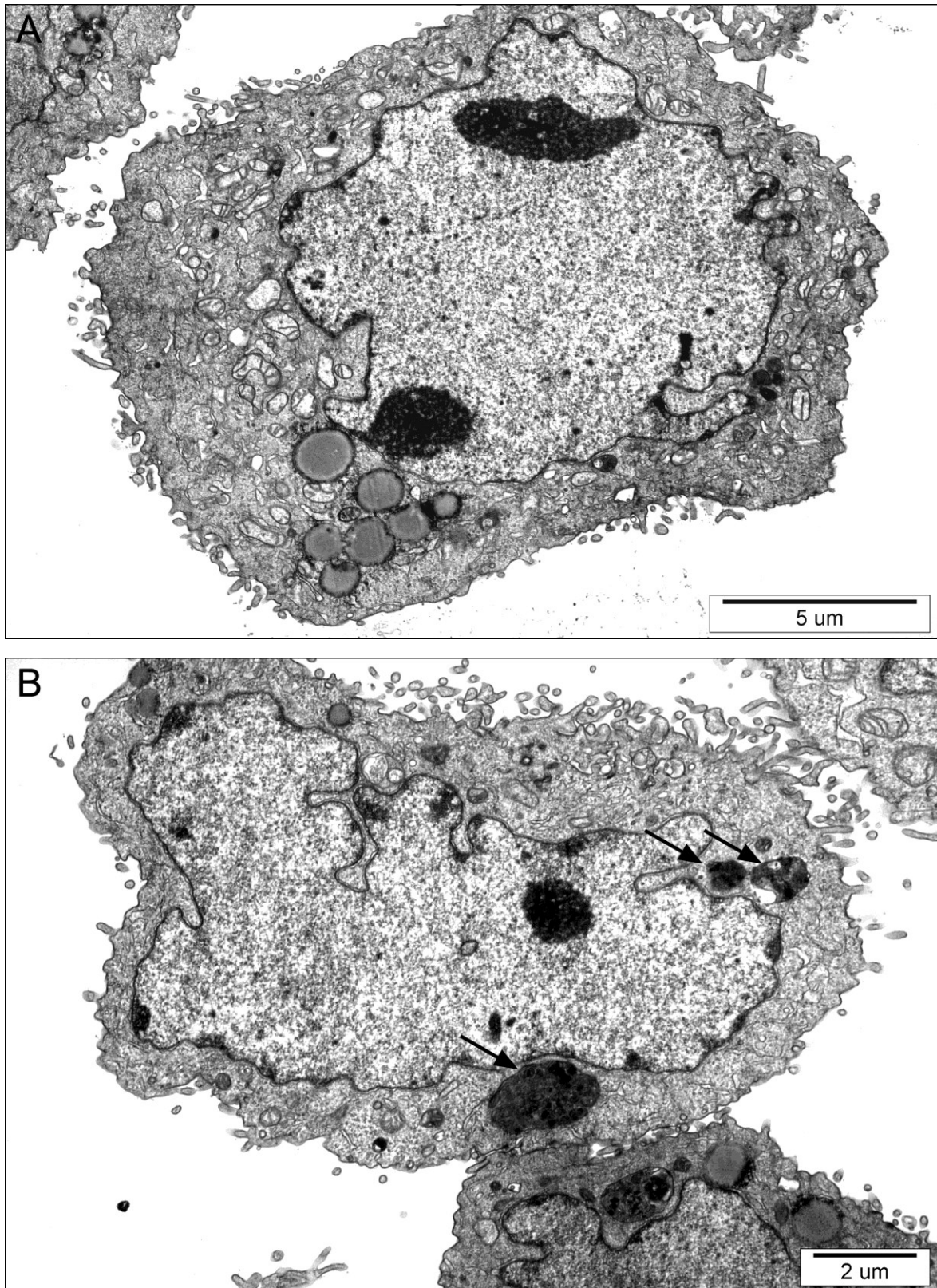
**Ryc. 10**

Wpływ werapamilu na ultrastrukturę komórek COLO 205. **A**, Kontrolna (nietraktowana werapamilem) komórka linii COLO 205. **B**, Komórka linii COLO 205 pod wpływem 24 godz. inkubacji z werapamilem ( $100 \mu\text{M}$ ) z zaznaczonymi wakuolami autofagowymi otaczającymi fragmenty cytoplazmy i organelli komórkowych (strzałki).



Ryc. 11

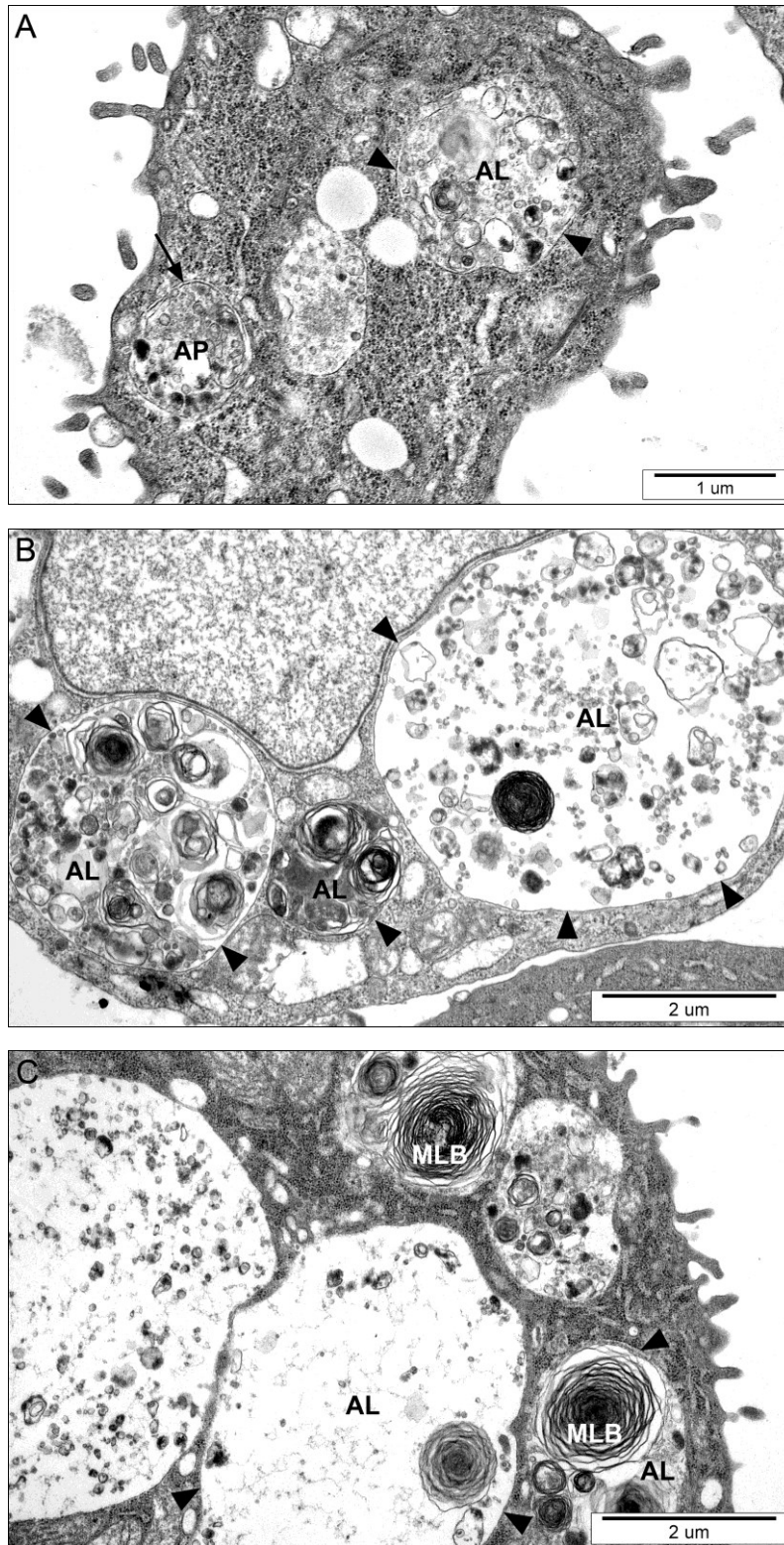
Wpływ werapamilu na ultrastrukturę komórek PC-3. A, Kontrolna (nietraktowana werapamilem) komórka linii PC-3. B, Komórka linii PC-3 pod wpływem 24 godz. inkubacji z werapamilem ( $100 \mu\text{M}$ ) z zaznaczonymi wakuolami autofagowymi otaczającymi fragmenty cytoplazmy i organelli komórkowych (strzałki).



Ryc. 12

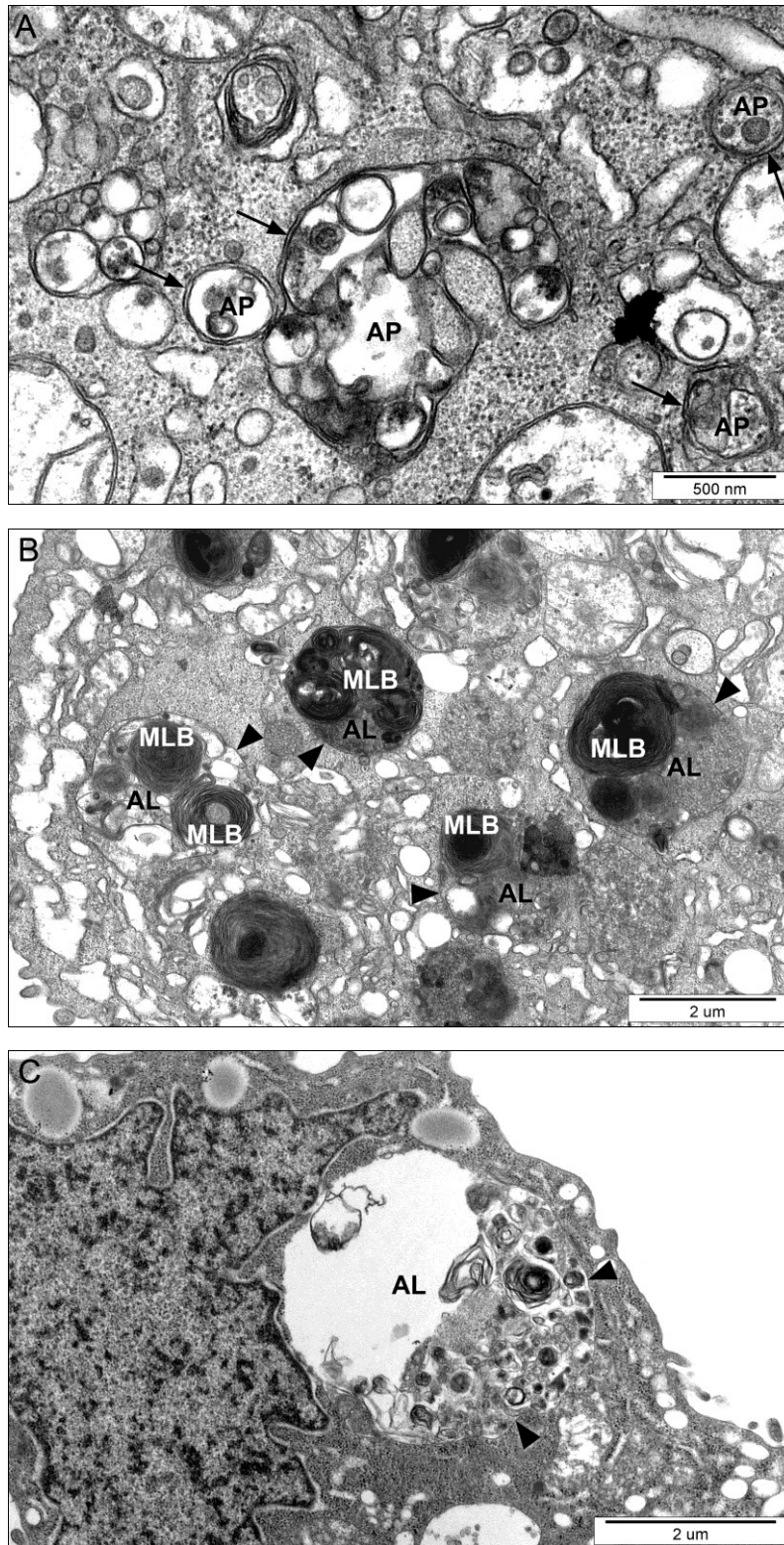
Wpływ werapamilu na ultrastrukturę komórek PNT-2. **A**, Kontrolna komórka linii PNT-2 nietraktowana werapamilem (kontrola). **B**, Komórka linii PNT-2 pod wpływem 24 godz. inkubacji z werapamilem ( $100 \mu\text{M}$ ) z zaznaczonymi wakuolami autofagowymi otaczającymi fragmenty cytoplazmy i organelli komórkowych (strzałki).





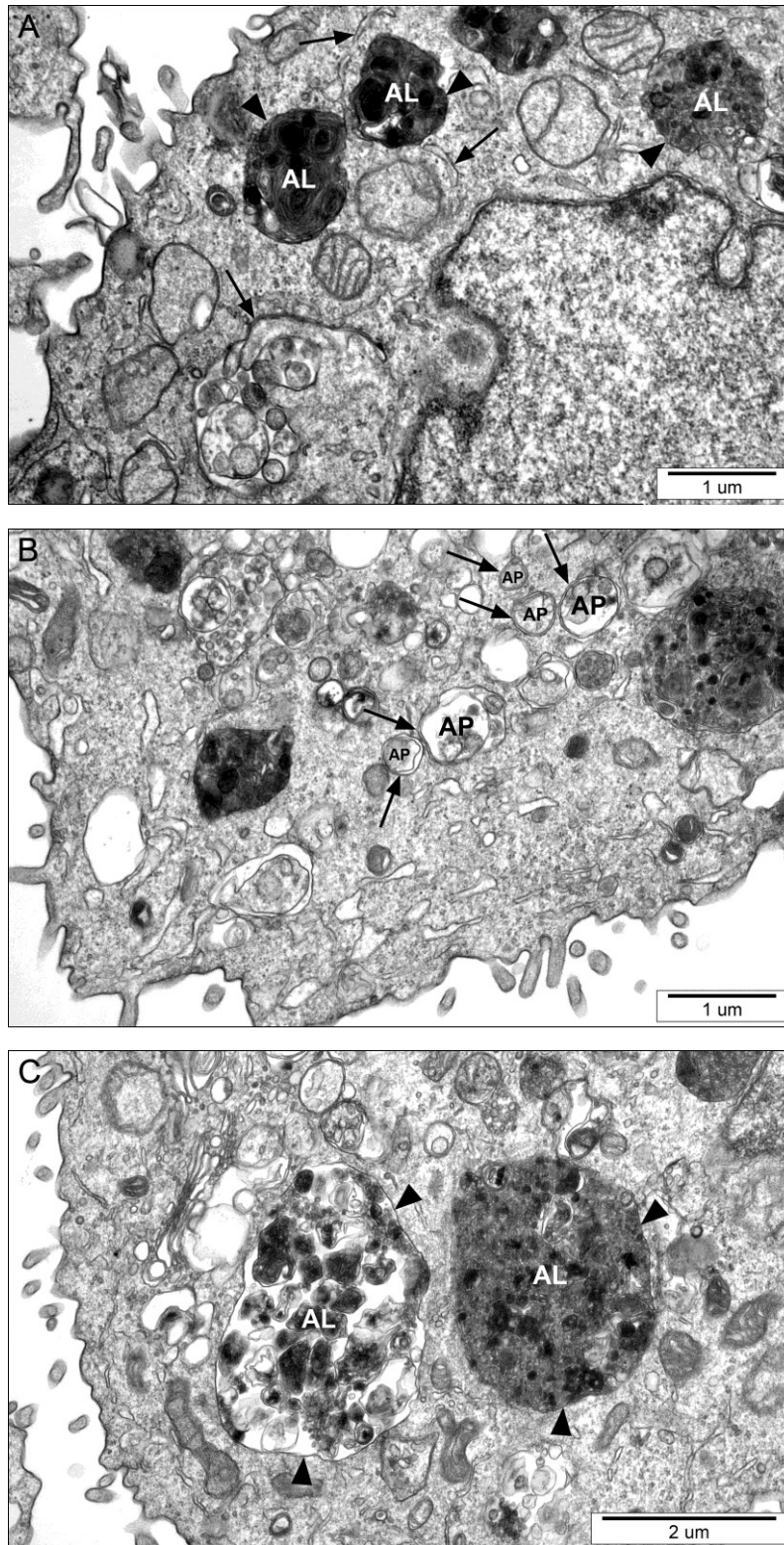
Ryc. 13

Różne etapy formowania wakuol autofagowych w komórkach COLO 205 traktowanych werapamilem (100  $\mu$ M; **A** – 6 godz., **B** – 12 godz., **C** – 24 godz.). **A**, Wczesna wakuola autofagowa – autofagosom (AP) o podwójnej błonie (strzałki), późne wakuole autofagowe – autofagolizosomy (AL) o pojedynczej błonie (groty). **B**, Autofagolizosomy (AL) o zróżnicowanej zawartości treści cytoplazmatycznej i pojedynczej błonie (groty). **C**, Struktury mielinopodobne (MLB) w obrębie wakuol autofagowych (AL) o pojedynczej błonie (groty).



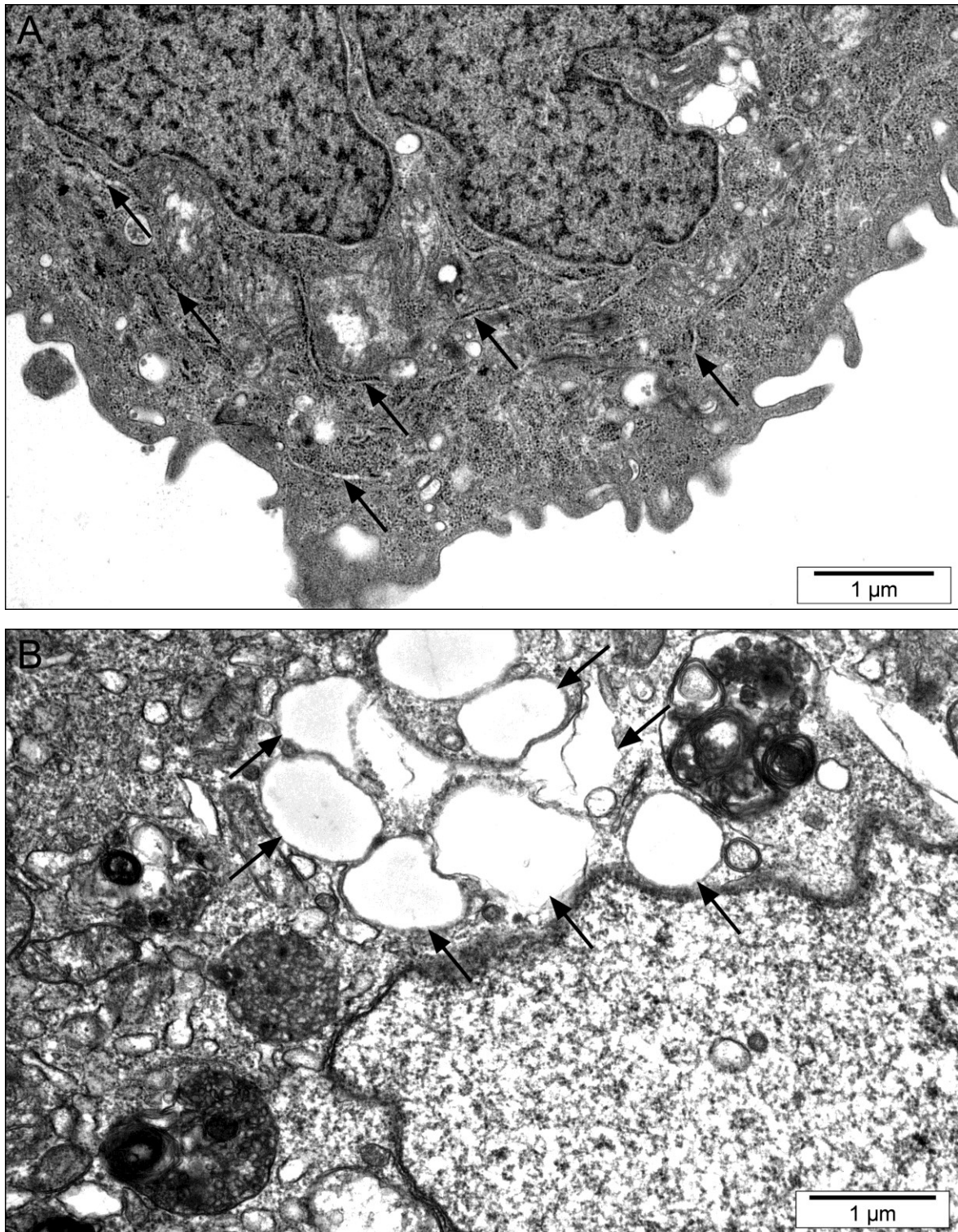
Ryc. 14

Różne etapy formowania wakuol autofagowych w komórkach PC-3 traktowanych werapamilem (100  $\mu$ M; **A** – 6 godz., **B** – 12 godz., **C** – 24 godz.). **A**, Wczesne wakuole autofagowe – autofagosomy (AP) o podwójnej błonie (strzałki). **B**, Elektronowo gęste późne wakuole autofagowe – autofagolizosomy (AL) o pojedynczej błonie (groty) zawierające struktury mielinopodobne (MLB). **C**, Częściowo zdegradowana późna wakuola autofagowa – autofagolizosom (AL) o pojedynczej błonie (groty).



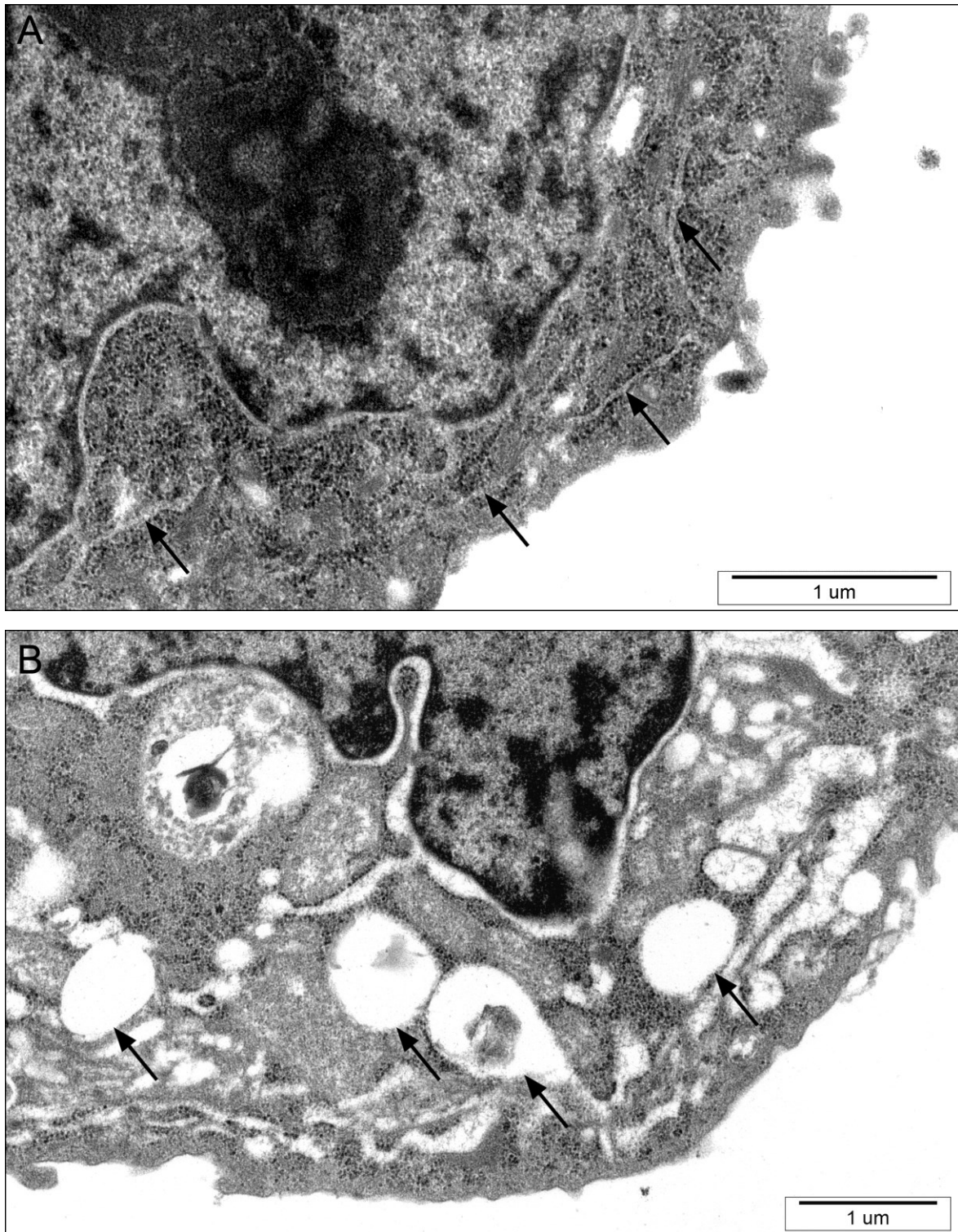
Ryc. 15

Różne etapy formowania wakuol autofagowych w komórkach PNT-2 traktowanych werapamilem (100  $\mu$ M, 24 h). **A**, fagofory (strzałki) otaczające organella komórki, późne wakuole autofagowe – autofagolizosomy (AL) o pojedynczych błonach (groty). **B**, Wczesne wakuole autofagowe – autofagosomy (AP) o podwójnych błonach (strzałki). **C**, Późne wakuole autofagowe – autofagolizosomy (AL) o pojedynczej błonie (groty) i zróżnicowanej zawartości fragmentów cytoplazmy i organellów komórkowych.



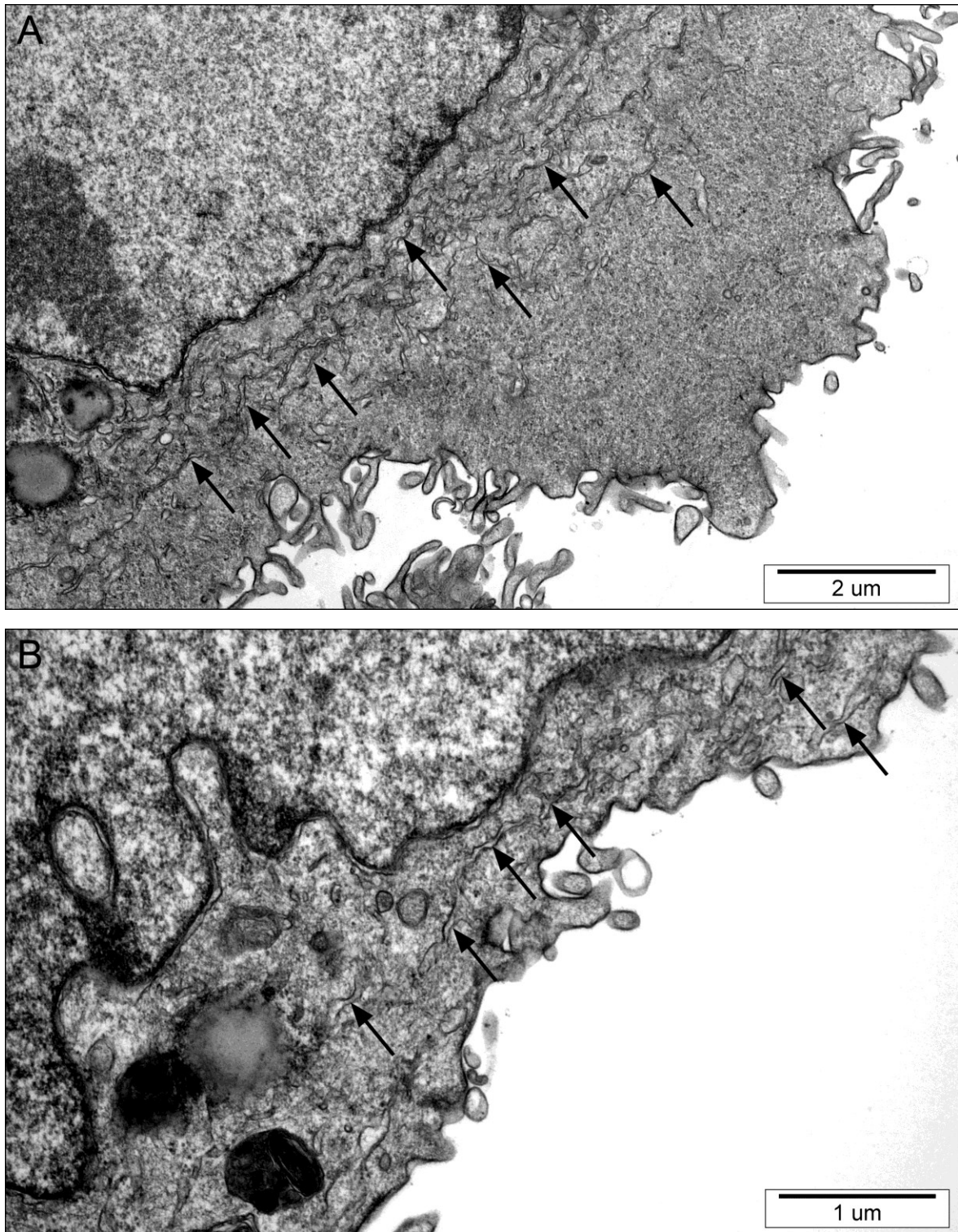
**Ryc. 16**

Wpływ werapamilu na ultrastrukturę siateczki śródplazmatycznej w komórkach COLO 205. **A**, Siateczka śródplazmatyczna (strzałki) w kontrolnej (nieotraktowanej werapamilem) komórce linii COLO 205. **B**, Siateczka śródplazmatyczna (strzałki) o poszerzonych kanałach w komórce linii COLO 205 pod wpływem 24 godz. inkubacji z werapamilem (100 µM).



**Ryc. 17**

Wpływ werapamilu na ultrastrukturę siateczki śródplazmatycznej w komórkach PC-3. **A**, Siateczka śródplazmatyczna (strzałki) w kontrolnej (nieotraktowanej werapamilem) komórce linii PC-3. **B**, Siateczka śródplazmatyczna (strzałki) o poszerzonych kanałach w komórce linii PC-3 pod wpływem 24 godz. inkubacji z werapamilem (100 µM).

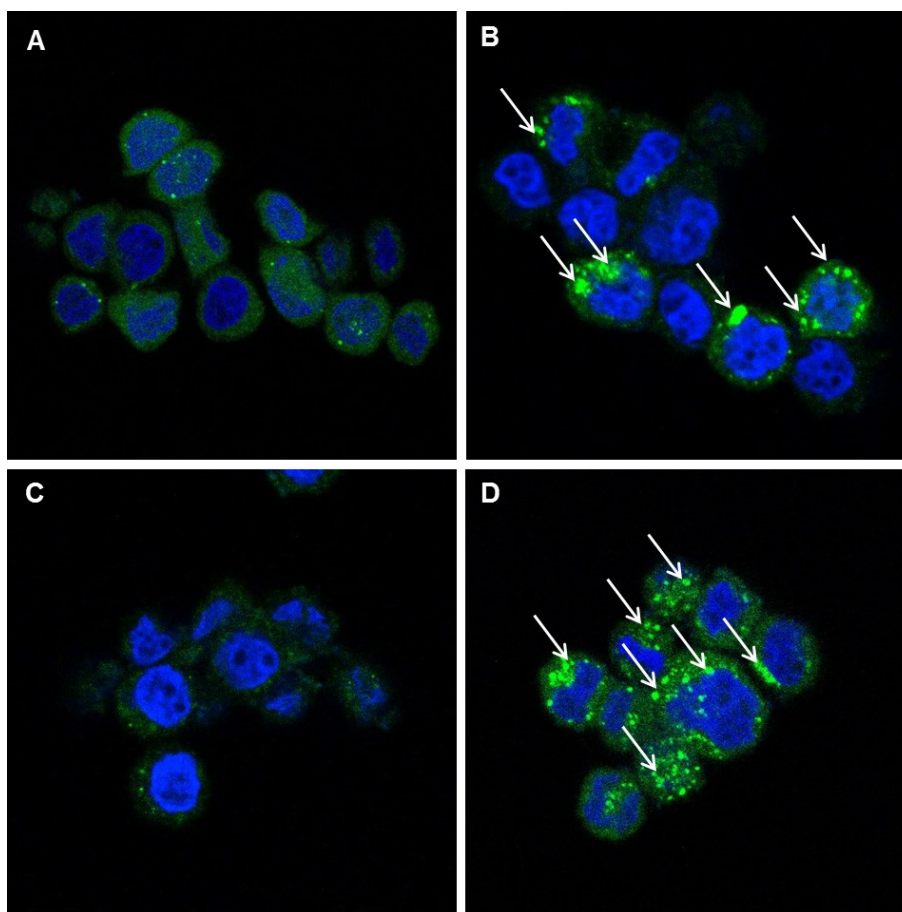


**Ryc. 18**

Wpływ werapamilu na ultrastrukturę siateczki śródplazmatycznej w komórkach PNT-2. **A**, Siateczka śródplazmatyczna (strzałki) w kontrolnej (nieotraktowanej werapamilem) komórce linii PNT-2. **B**, Siateczka śródplazmatyczna (strzałki) w komórce linii PNT-2 pod wpływem 24 godz. inkubacji z werapamilem (100 μM).

## 5.3 Wpływ werapamilu na autofagię

Aby potwierdzić zdolność werapamilu do indukcji autofagii przeprowadzono obserwacje lokalizacji białka MAP LC3 w mikroskopie konfokalnym. Białko w formie MAP LC3-I znajduje się rozproszone w cytoplazmie komórki, natomiast w formie MAP LC3-II jest związane z błoną autofagosomu. W komórkach COLO 205 oraz PC-3 ekspresujących egzogenne białko MAP LC3 sprzężone z białkiem zielonej fluorescencji GFP po 6 godz. inkubacji z werapamilem (100  $\mu$ M) zaobserwowano akumulację MAP LC3-II widoczną w obrazie mikroskopowym jako świecące na zielono punkty (*GFP-LC3 puncta*). W komórkach kontrolnych (nie traktowanych werapamilem) dominowała cytozolowa forma MAP LC3-I dająca obraz rozproszonej fluorescencji (Ryc. 19).

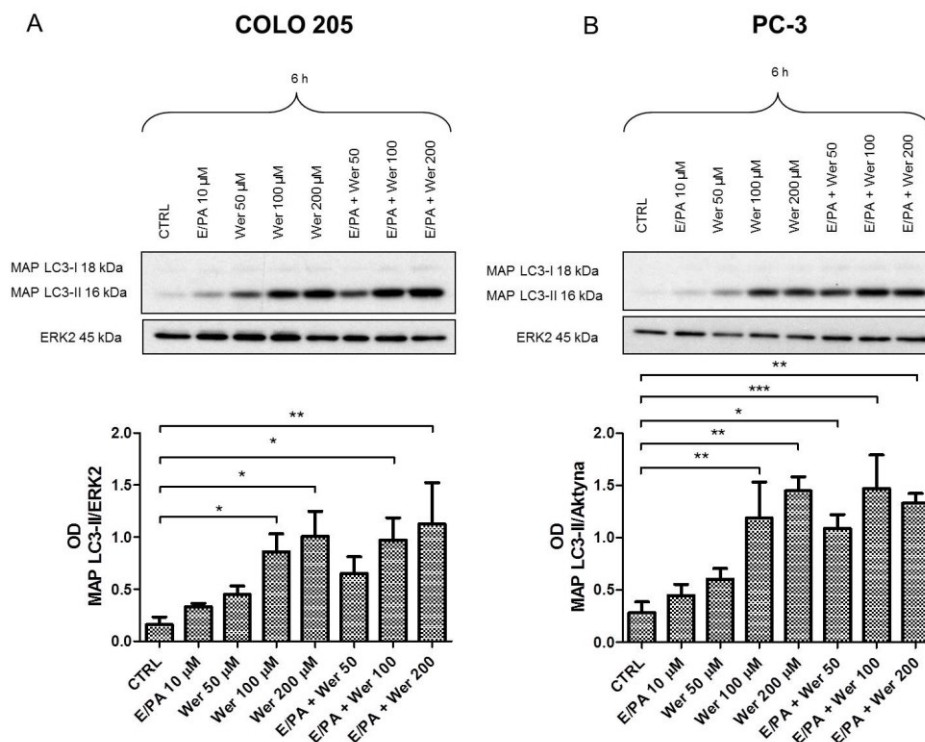


Ryc. 19

Wpływ inhibitora kanałów wapniowych typu L – werapamilu (100  $\mu$ M, 6 godz.) na lokalizację białka MAP LC3-II w błonie autofagosomów (powiększenie 63x/1.40). **A**, Kontrolne komórki COLO 205; **B**, Komórki COLO 205 z widoczną akumulacją MAP LC-II (strzałki) pod wpływem werapamilu; **C**, Kontrolne komórki PC-3; **D**, Komórki PC-3 z widoczną akumulacją MAP LC-II (strzałki) pod wpływem werapamilu.

## WYNIKI

Nagromadzenie autofagosomów w komórce może być jednocześnie oznaką indukcji jak i zablokowania autofagii. W celu wyjaśnienia czy werapamil wywołuje czy raczej blokuje autofagię, wykonano analizę Western blot porównując ekspresję białka MAP LC3-II pod wpływem werapamilu w obecności lub bez inhibitorów proteaz lizosomalnych – E64d (10  $\mu$ M) i pepstatyny A (10  $\mu$ M), które hamują proces autofagii (Ryc. 20). W komórkach COLO 205 (Ryc. 20A) oraz w komórkach PC-3 (Ryc. 20B) blokowanie autofagii przez inhibitory proteaz lizosomalnych spowodowało akumulację MAP LC3-II, jednak zastosowanie werapamilu (100, 200  $\mu$ M) już po 6 godzinach doświadczenia w stopniu istotnym statystycznie podwyższyło ekspresję MAP LC3-II. Ponadto ekspresja MAP LC3-II istotnie wzrosła ( $p < 0,05$ ) również pod wpływem jednoczesnego działania werapamilu oraz inhibitorów proteaz lizosomalnych. Świadczy to o indukowaniu przez werapamil autofagii w komórkach COLO 205 i PC-3. Ekspresja białka MAP LC3-I w porównaniu do MAP LC3-II była prawie niewykrywalna.



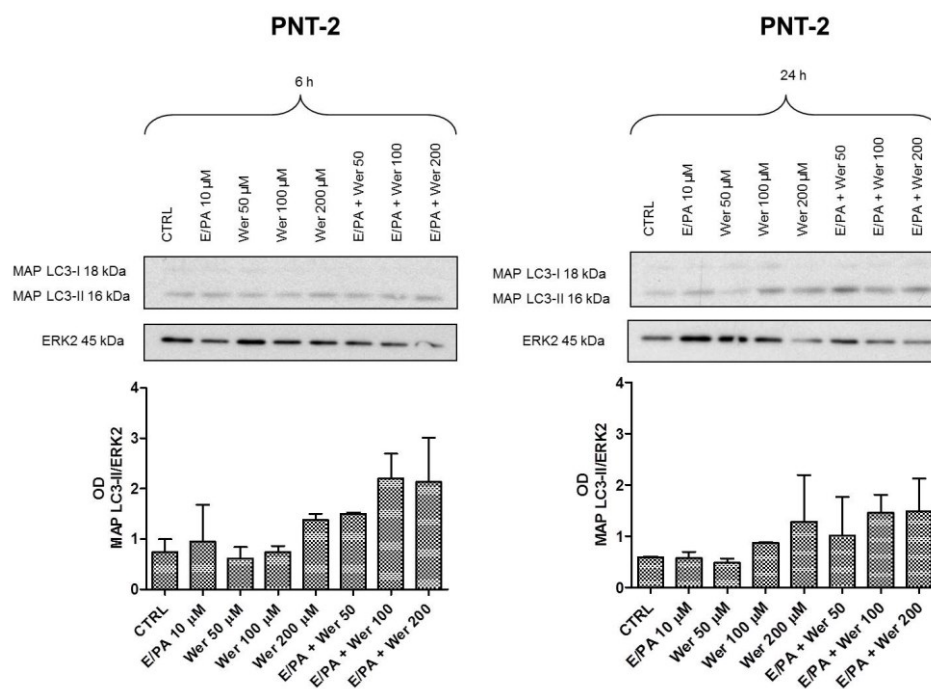
**Ryc. 20**

Wpływ wzrastających stężeń inhibitora kanałów wapniowych typu L - werapamilu (Wer, 50, 100, 200  $\mu$ M) w obecności lub bez inhibitorów proteaz lizosomalnych – E64d i pepstatyny A (E/PA, 10  $\mu$ M) na ekspresję białka MAP LC3-II w komórkach linii COLO-205 (A) oraz PC-3 (B). Górne panele prezentują wyniki analizy Western Blot. Przedstawione wykresy (panele dolne) ilustrują współczynniki gęstości optycznej (gęstość optyczna MAP LC3-II/gęstość optyczna ERK2 zastosowanego jako białko odniesienia, OD). Słupki oznaczają wartości średnie ( $\pm$  SEM) uzyskane z trzech doświadczeń, przy wielokrotnym powtórzeniu blotów. Gwiazdkami zaznaczono średnie istotnie statystycznie różne w stosunku do kontroli (CTRL) (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).



## WYNIKI

W komórkach linii PNT-2 ekspresja białka MAP LC3-II wykazywała tendencję wzrostową w szczególności pod wpływem działania wysokiego stężenia werapamilu (200  $\mu\text{M}$ ) oraz jednoczesnego działania werapamilu oraz inhibitorów lizosomalnych proteaz. Jednakże w odróżnieniu od linii komórek nowotworowych, w komórkach PNT-2 ekspresja MAP LC3-II po 6 i 24 godzinach inkubacji z werapamilem nie była w stopniu statystycznie istotnym wyższa od ekspresji MAP LC3-II zaobserwowanej po zastosowaniu wyłącznie E64d i pepstatyny A. Ekspresja białka MAP LC3-I w porównaniu do MAP LC3-II była prawie niewykrywalna (Ryc. 21).

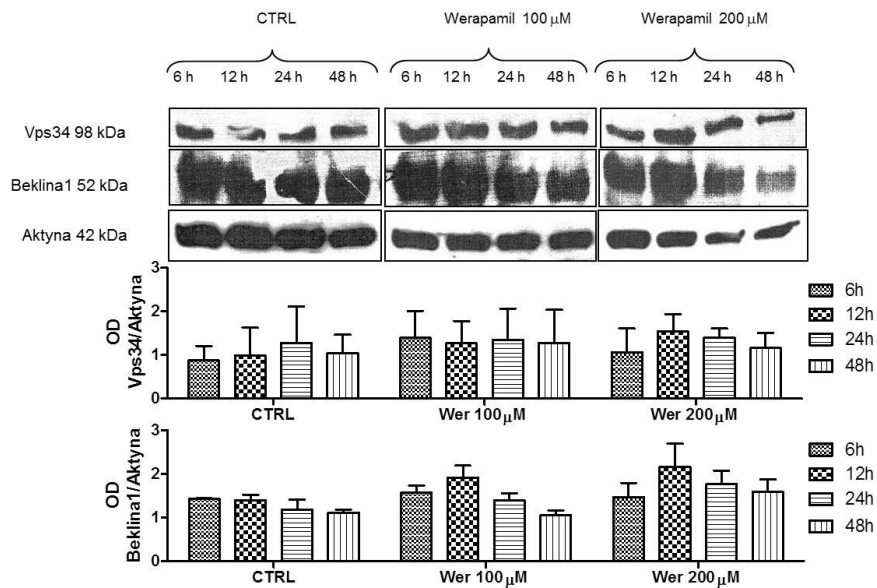


**Ryc. 21**

Wpływ wzrastających stężeń inhibitora kanałów wapniowych typu L - werapamilu (Wer, 50, 100, 200  $\mu\text{M}$ ) w obecności lub bez inhibitorów proteaz lizosomalnych – E64d i pepstatyny A (E/PA, 10  $\mu\text{M}$ ) na ekspresję białka MAP LC3-II w komórkach linii PNT-2. Górne panele prezentują wyniki analizy Western Blot. Przedstawione wykresy (panele dolne) ilustrują współczynniki gęstości optycznej (gęstość optyczna MAP LC3-II/gęstość optyczna ERK2 zastosowanego jako białko odniesienia, OD). Słupki oznaczają wartości średnie ( $\pm$  SEM) uzyskane z trzech doświadczeń, przy wielokrotnym powtórzeniu blotów. Gwiazdkami zaznaczono średnie istotnie statystycznie różne w stosunku do kontroli (CTRL) (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

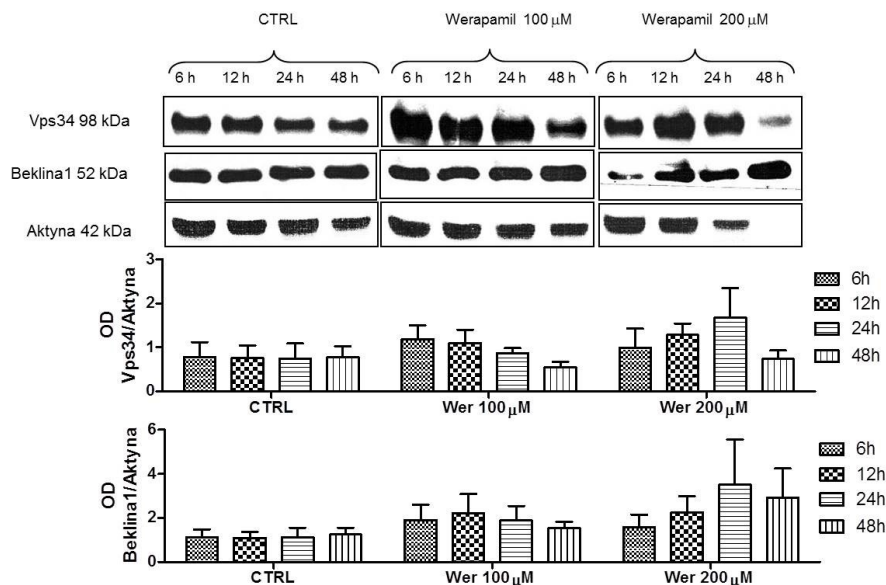
W komórkach COLO 205 (Ryc. 22) oraz PC-3 (Ryc. 23) traktowanych werapamilem nie stwierdzono również istotnego statystycznie podwyższenia ekspresji białek kluczowych dla procesu autofagii: Vps34 (PI3K III) oraz Bekliny 1. Ekspresja Bcl-2, białka antyapoptozy hamującego proces autofagii, również nie zmieniła się w stopniu statystycznie istotnym pod wpływem działania werapamilu (Ryc. 24).

## WYNIKI



**Ryc. 22**

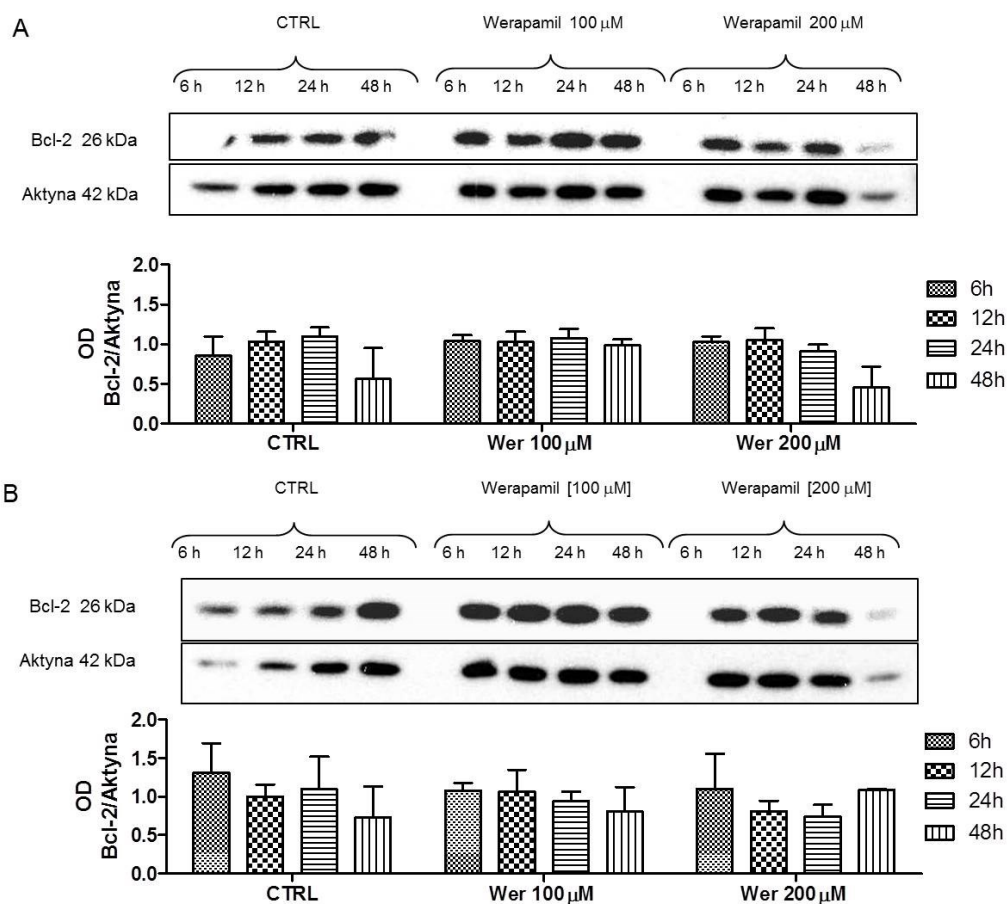
Wpływ wzrastających stężeń inhibitora kanałów wapniowych typu L - werapamilu (Wer, 100, 200  $\mu$ M) na ekspresję białek Bekliny1 i Vps34 w komórkach linii COLO 205. Górny panel prezentuje wyniki analizy Western Blot. Przedstawione wykresy (panele dolne) ilustrują współczynniki gęstości optycznej (gęstość optyczna badanego białka /gęstość optyczna aktyny zastosowanej jako białko odniesienia, OD). Słupki oznaczają wartości średnie ( $\pm$  SEM) uzyskane z trzech doświadczeń przy wielokrotnym powtórzeniu blotów. CTRL – kontrola.



**Ryc. 23**

Wpływ wzrastających stężeń inhibitora kanałów wapniowych typu L - werapamilu (Wer, 100, 200  $\mu$ M) na ekspresję białek Bekliny1 i Vps34 w komórkach linii PC-3. Górny panel prezentuje wyniki analizy Western Blot. Przedstawione wykresy (panele dolne) ilustrują współczynniki gęstości optycznej (gęstość optyczna badanego białka /gęstość optyczna aktyny zastosowanej jako białko odniesienia, OD). Słupki oznaczają wartości średnie ( $\pm$  SEM) uzyskane z trzech doświadczeń przy wielokrotnym powtórzeniu blotów. CTRL – kontrola.

## WYNIKI



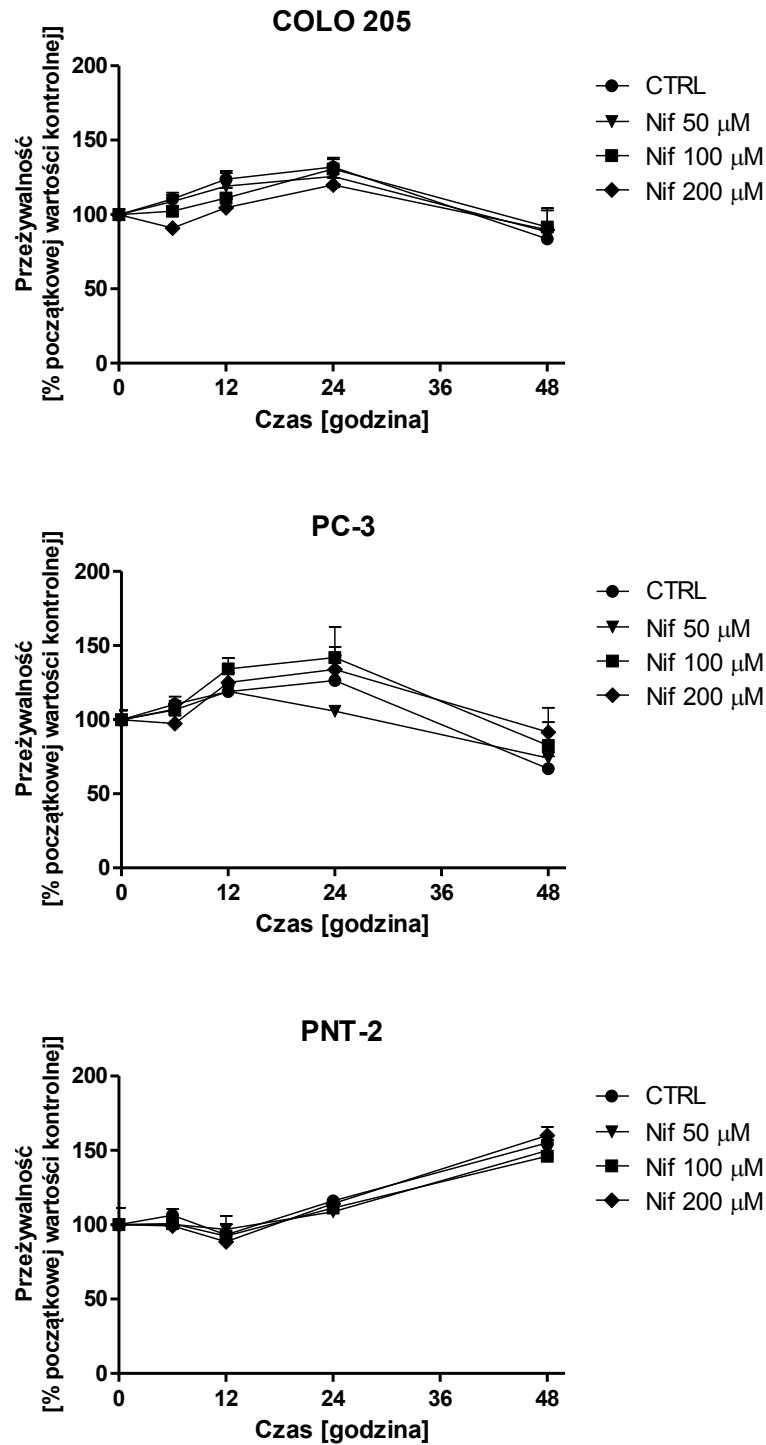
**Ryc. 24**

Wpływ wzrastających stężeń inhibitora kanałów wapniowych typu L - werapamilu (Wer, 100, 200  $\mu$ M) na ekspresję białka Bcl-2 w komórkach linii COLO 205 (A) i PC-3 (B). Górne panele prezentują wyniki analizy Western Blot. Przedstawione wykresy (panele dolne) ilustrują współczynniki gęstości optycznej (gęstość optyczna badanego białka /gęstość optyczna aktyny zastosowanej jako białko odniesienia, OD). Słupki oznaczają wartości średnie ( $\pm$  SEM) uzyskane z trzech doświadczeń przy wielokrotnym powtórzeniu blotów. CTRL – kontrola.

#### 5.4 Wpływ nifedypiny – swoistego inhibitora kanałów wapniowych typu L na przeżywalność oraz proliferację komórek COLO 205, PC-3 i PNT-2

Aby zweryfikować hipotezę o możliwym indukowaniu autofagii przez zablokowanie aktywności kanałów wapniowych typu L wykonano doświadczenie z bardziej swoistym niż werapamil blokerem tych kanałów – nifedypiną (50 – 200  $\mu\text{M}$ ). Zastosowanie nifedypiny zamiast werapamilu nie spowodowało jednak obniżenia przeżywalności w żadnej z testowanych linii komórkowych (Ryc. 25). Odsetek żywych komórek COLO 205 po 48h inkubacji z nifedypiną (200  $\mu\text{M}$ ) wynosił  $89,75 \pm 13,04\%$  ( $P>0,05$ ), PC-3 -  $91,66 \pm 16,47\%$  ( $P>0,05$ ) a PNT-2 –  $160,04 \pm 3,34\%$  ( $P>0,05$ ), względem początkowej wartości kontrolnej (komórki nietraktowane nifedypiną w czasie  $T=0$ ). Natężenie proliferacji komórek PC-3 było istotnie statystycznie niższe w 48 godzinie traktowania nifedypiną (200  $\mu\text{M}$ ) i wynosiło  $69,79 \pm 9,38\%$  ( $P<0,001$ ), podczas gdy w komórkach COLO 205 wynosiło  $62,57 \pm 4,42\%$  ( $P>0,05$ ) a w komórkach PNT-2 stanowiło  $61,99 \pm 2,82\%$  ( $P>0,05$ ) początkowej wartości kontrolnej (komórki nietraktowane nifedypiną w czasie  $T=0$ ) (Ryc. 26). Dodatkowo w przypadku komórek linii PNT-2, proliferacja pod wpływem nifedypiny różniła się w sposób statystycznie istotny od proliferacji komórek kontrolnych w czasie 6-24 godz.

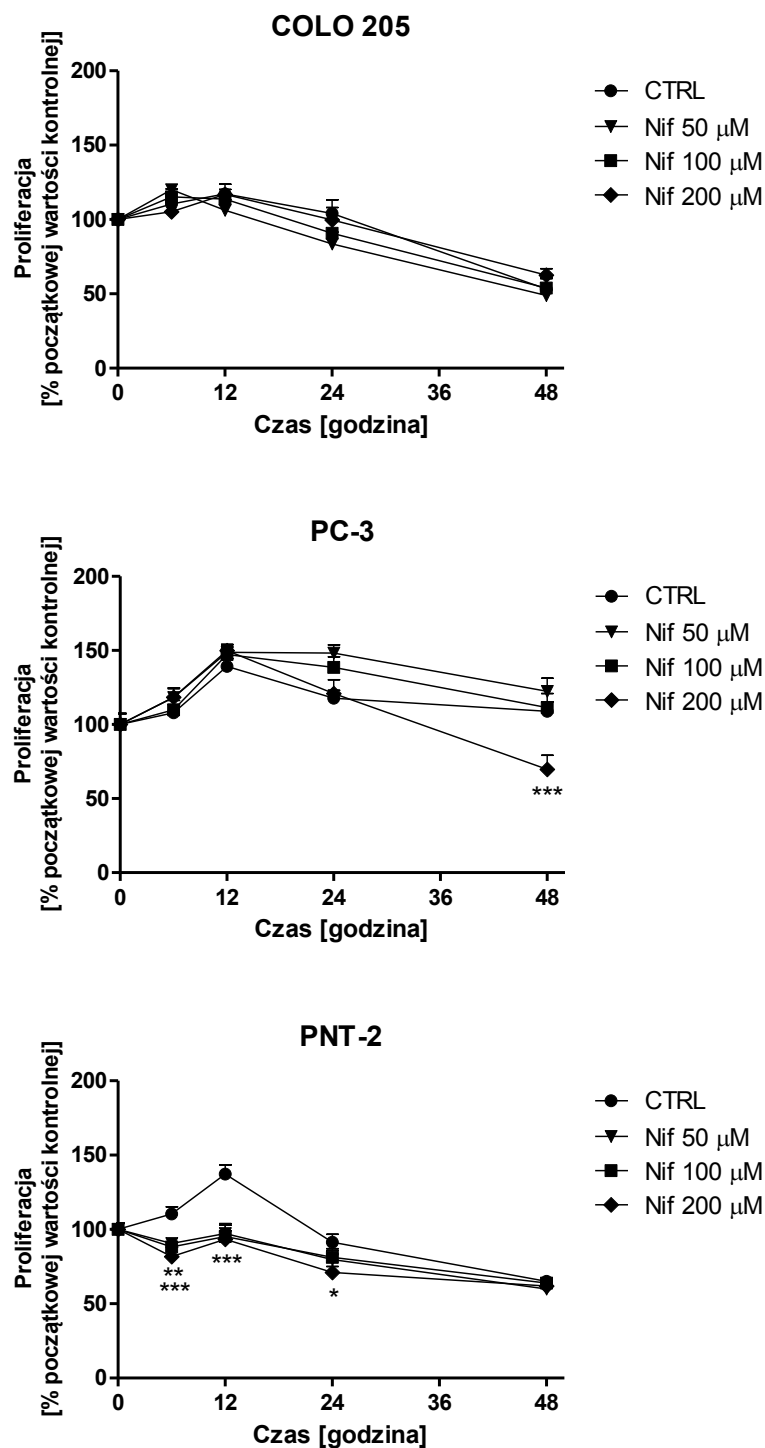
## WYNIKI



Ryc. 25

Wpływ inhibitora kanałów wapniowych typu L - nifedypiny (Nif, 50, 100, 200 μM) na przeżywalność komórek wymienionych linii komórkowych (test MTT). Punkty oznaczają wartości średnie ( $\pm$  SEM) uzyskane z trzech doświadczeń w czterech powtórzeniach. CTRL - kontrola.

## WYNIKI

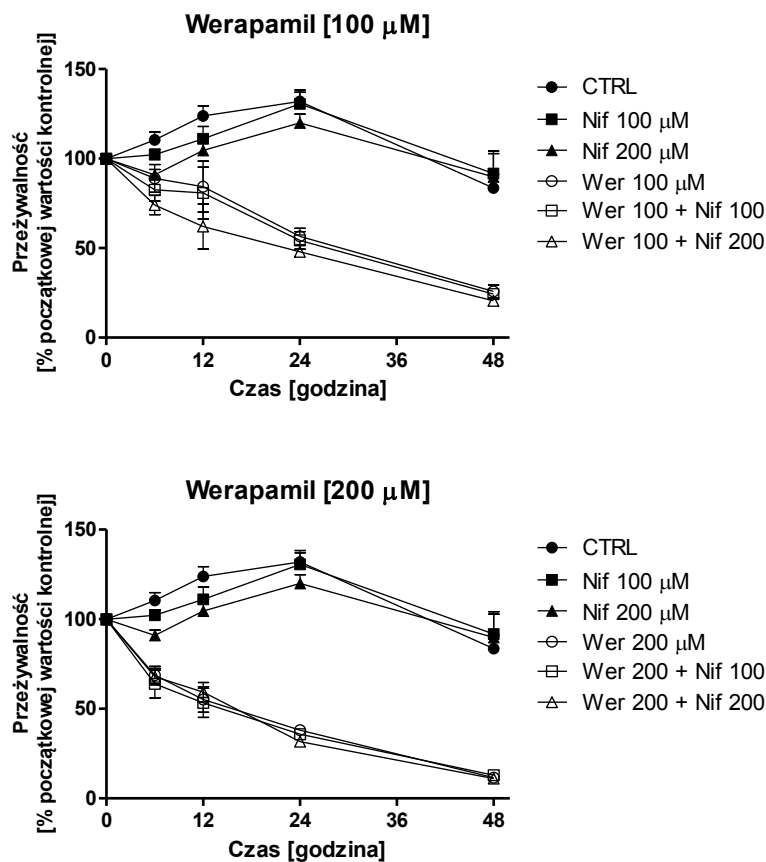


**Ryc. 26**

Wpływ inhibitora kanałów wapniowych typu L – nifedypiny (Nif, 50, 100, 200 μM) na proliferację komórek wymienionych linii komórkowych (test z fioletem krystalicznym). Punkty oznaczają wartości średnie ( $\pm$  SEM) uzyskane z trzech doświadczeń w czterech powtórzeniach. Gwiazdki oznaczają średnie dla traktowań nifedypiną, które różnią się w stopniu statystycznie istotnym (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ) od średnich w układzie kontrolnym (CTRL) w odpowiadających sobie punktach pomiaru czasowego (6, 12, 24, 48 godz.).

## WYNIKI

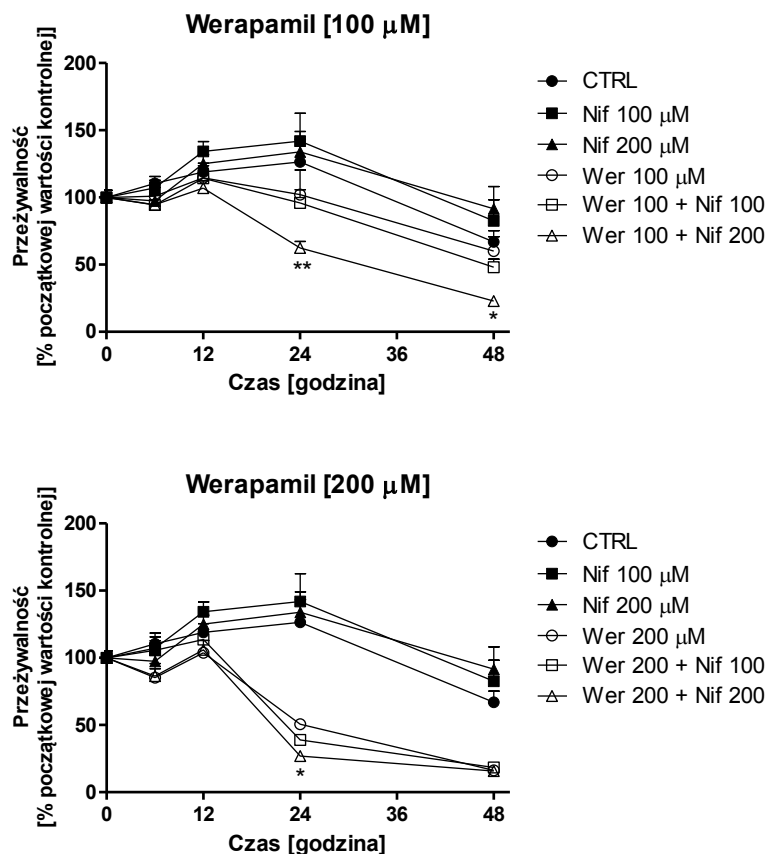
W przypadku komórek COLO 205 jednoczesne podawanie werapamilu i nifedypiny nie obniżyło przeżywalności komórek bardziej niż spowodował to sam werapamil (Ryc. 27), natomiast w komórkach PC-3 dodatek nifedypiny (200  $\mu\text{M}$ ) wzmacniał cytotoksyczność werapamilu (100, 200  $\mu\text{M}$ ) (Ryc. 28).



Ryc. 27

Wpływ inhibitora kanałów wapniowych typu L - nifedypiny (Nif, 100, 200  $\mu\text{M}$ ) oraz nifedypiny w obecności werapamilu (Wer, 100, 200  $\mu\text{M}$ ) na przeżywalność komórek linii komórkowej COLO 205 (test MTT). Punkty oznaczają wartości średnie ( $\pm$  SEM) uzyskane z trzech doświadczeń w czterech powtórzeniach. CTRL - kontrola.

## WYNIKI



Ryc. 28

Wpływ inhibitora kanałów wapniowych typu L - nifedypiny (Nif, 100, 200 μM) oraz nifedypiny w obecności werapamilu (Wer, 100, 200 μM) na przeżywalność komórek linii komórkowej PC-3 (test MTT). Punkty oznaczają wartości średnie (± SEM) uzyskane z trzech doświadczeń w czterech powtórzeniach. Gwiazdkami oznaczono istotności statystyczne obliczone dla wartości średnich: werapamil + nifedypina vs werapamil (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ), w odpowiadających sobie punktach pomiaru czasowego (24, 48 godz.). CTRL – kontrola.

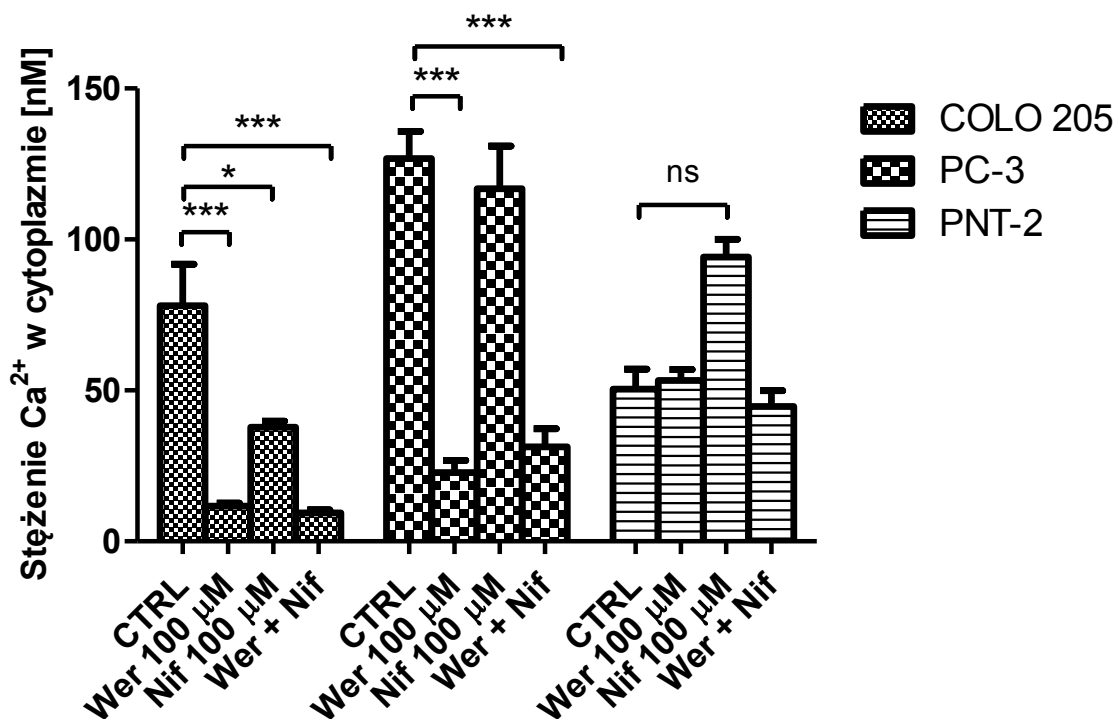
### 5.5 Wpływ inhibitorów kanałów wapniowych typu L na wewnątrzkomórkową pulę jonów $Ca^{2+}$ w komórkach COLO 205, PC-3 i PNT-2

Stężenie zjonizowanego wapnia w cytoplazmie  $[Ca^{2+}]_c$ , zmierzone w oparciu o fluorescencję emitowaną przez marker FURA-2 w komórkach COLO 205 w warunkach kontrolnych wynosiło  $78,08 \pm 13,79$  nM natomiast po 24 h inkubacji z werapamilem (100 μM) wynosiło  $11,71 \pm 0,94$  nM ( $P < 0,001$ ). W komórkach PC-3 również zaobserwowano obniżenie  $[Ca^{2+}]_c$  pod wpływem werapamilu działającego 24 godziny, które wynosiło  $22,81 \pm 3,96$  ( $P < 0,001$ ) w porównaniu z  $126,85 \pm 9,02$  nM w warunkach kontrolnych. W tych samych warunkach stężenie  $[Ca^{2+}]_c$  w komórkach PNT-2 wynosiło  $50,48 \pm 6,60$  nM (kontrola) i  $53,27 \pm 3,64$  nM ( $P > 0,05$ ) (werapamil 100 μM). Zastosowanie nifedypiny spowodowało obniżenie stężenia  $[Ca^{2+}]_c$  do  $37,77$



## WYNIKI

$\pm 2,05$  nM ( $P < 0,05$ ) w komórkach COLO 205. Natomiast w pozostałych liniach komórkowych zastosowanie nifedypiny albo nie zmniejszyło stężenia  $[Ca^{2+}]_c$  które wynosiło  $116,76 \pm 14,17$  nM ( $P > 0,05$ ) w komórkach PC-3 i  $94,14 \pm 5,89$  nM ( $P > 0,05$ ) w komórkach PNT-2. Jednoczesne użycie werapamilu oraz nifedypiny obniżyło jednak stężenie  $[Ca^{2+}]_c$  do wartości  $9,47 \pm 1,03$  nM ( $P < 0,001$ ) w komórkach COLO 205 oraz  $31,37 \pm 5,91$  nM ( $P < 0,001$ ) w komórkach PC-3. Stężenie  $[Ca^{2+}]_c$  w komórkach PNT-2 nie zmieniło się w stopniu statystycznie istotnym i wynosiło  $44,63 \pm 5,35$  nM ( $P > 0,05$ ) (Ryc. 29).



Ryc. 29

Wpływ inhibitorów kanałów wapniowych typu L – werapamilu i nifedypiny (Wer, Nif, 100  $\mu$ M) na stężenie zjonizowanego wapnia w cytoplazmie  $[Ca^{2+}]_c$  komórek wymienionych linii komórkowych (test FURA-2) po 24 godz. inkubacji. Słupki oznaczają wartości średnie ( $\pm$  SEM) uzyskane z trzech doświadczeń w czterech powtórzeniach. Gwiazdki oznaczają średnie ( $\pm$  SEM) uzyskane dla traktowań, które różnią się w stopniu statystycznie istotnym (\* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ) od średnich uzyskanych w układzie kontrolnym (CTRL). „ns” – nieistotnie statystycznie.

## 5.6 Analiza aktywności przepuszczalnych dla $\text{Ca}^{2+}$ kanałów błonowych w komórkach COLO 205 i PC-3

### 5.6.1 Pomiar napięciowo-zależnych prądów wapniowych

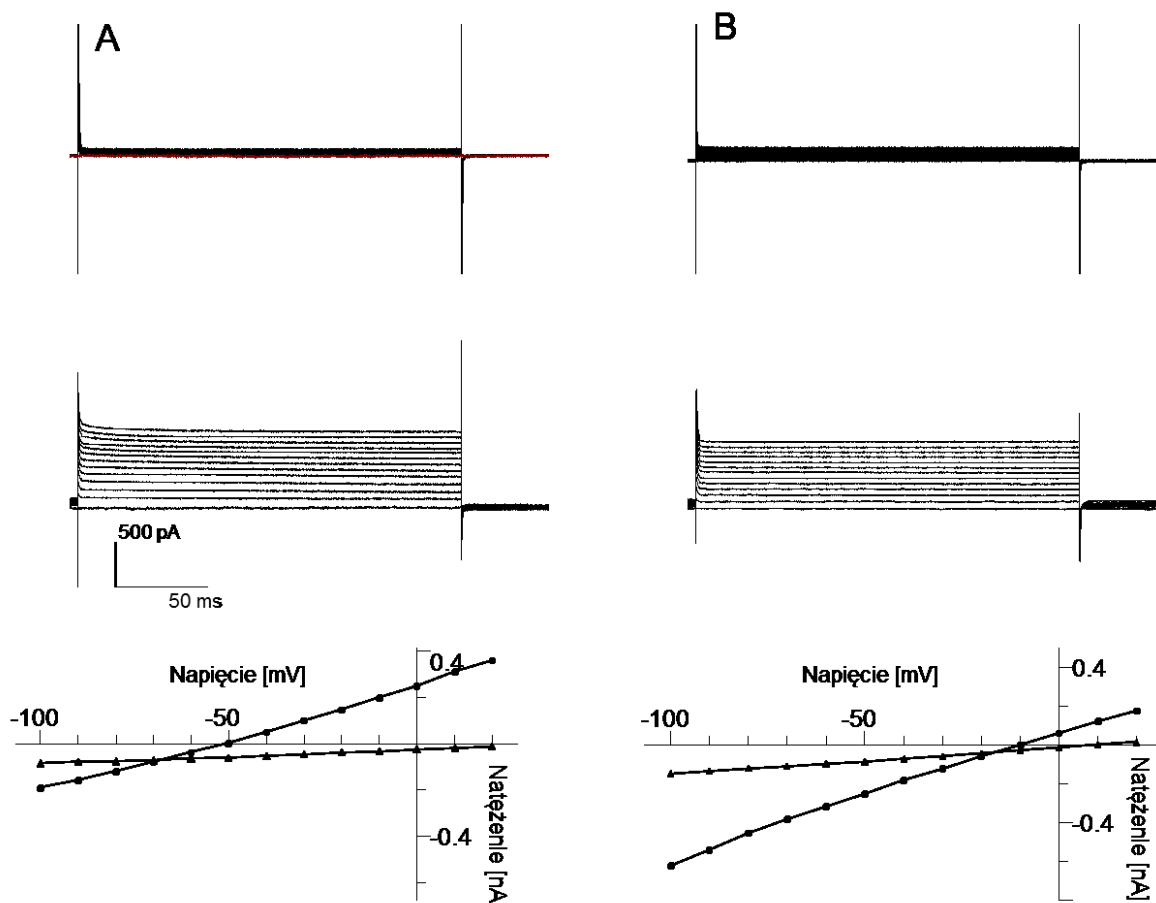
W celu zweryfikowania obecności kanałów wapniowych typu L w komórkach badanych linii komórkowych wykonano pomiary prądów wapniowych, indukowanych depolaryzacją błony komórkowej w obecności wysokiego stężenia wapnia w roztworze zewnątrzkomórkowym. Doświadczenie wykonano techniką patch-clamp w konfiguracji „whole-cell”, co umożliwiło pomiary prądów indukowanych przez kanały obecne w błonie całej komórki. Zarówno w komórkach COLO 205 jak i PC-3 w obecności glukonianu wapnia (70 mM) w roztworze zewnątrzkomórkowym, pod wpływem impulsów depolaryzujących błonę komórkową, nie zaobserwowano obecności dokomórkowych prądów wapniowych charakterystycznych dla obecności kanałów wapniowych typu L (dane nieprzedstawione). Po upływie kilku minut od rozpoczęcia stymulacji w niektórych komórkach zaobserwowano natomiast napięciowo-niezależny prąd liniowy. W dalszej kolejności zaplanowano doświadczenia mające na celu zbadanie zależnych od czasu prądów liniowych.

### 5.6.2 Pomiar prądów napięciowo-niezależnych (liniowych)

W celu zweryfikowania obecności kanałów wapniowych innych niż kanały napięciowo-zależne, tzn. kanałów napięciowo-niezależnych, wykonano rejestracje prądów w komórkach z zastosowaniem izosmolarnych roztworów zawierających kationy  $\text{Ca}^{2+}$  oraz kationy nieprzewodzone przez większość kanałów jonowych:  $\text{Cs}^+$  (przewodzone przez niektóre kanały TRP np. TRPC7, TRPM3, TRPM8, TRPML3, TRPV1-4, TRPA1) oraz kationy choliny -  $\text{C}_5\text{H}_{14}\text{NO}^+$  (przewodzone wyłącznie przez kanały TRP, w których zachodzi dylatacja poru (Chung i wsp., 2008, Chung i wsp., 2005, Banke i wsp., 2010). Roztwory wewnątrz i zewnątrzkomórkowe zawierały jednakowe stężenie jonów  $\text{Cl}^-$ . Bezpośrednio po uzyskaniu konfiguracji „whole-cell” w komórkach COLO 205 i PC-3 nie zarejestrowano widocznych prądów (Ryc. 30). Po upływie 1-2 min od rozpoczęcia rejestracji, obserwowano natomiast liniowy prąd o ujemnym (ok -40 mV) potencjale odwrócenia ( $V_r$ , potencjał przy którym obserwowane prądy zmieniają kierunek przepływu przez błonę komórkową) (Ryc. 30). Podobne prądy rejestrowano w roztworach o zredukowanym stężeniu chloru uzyskanych poprzez zastąpienie chlorku choliny (116 mM) octanem choliny (116 mM) oraz zastąpienie chlorku cezu (116 mM)

## WYNIKI

metanosulfonianem cezu (116 mM), odpowiednio w roztworze zewnątrz- i wewnątrzkomórkowym. Niezależność obserwowanego prądu od składu i stężenia anionów w roztworach oraz ujemny  $V_r$  dla symetrycznego gradientu anionów sugerują, iż prąd był spowodowany przepływem kationów: wapnia i choliny do wnętrza komórki, oraz cezu na zewnątrz komórki.

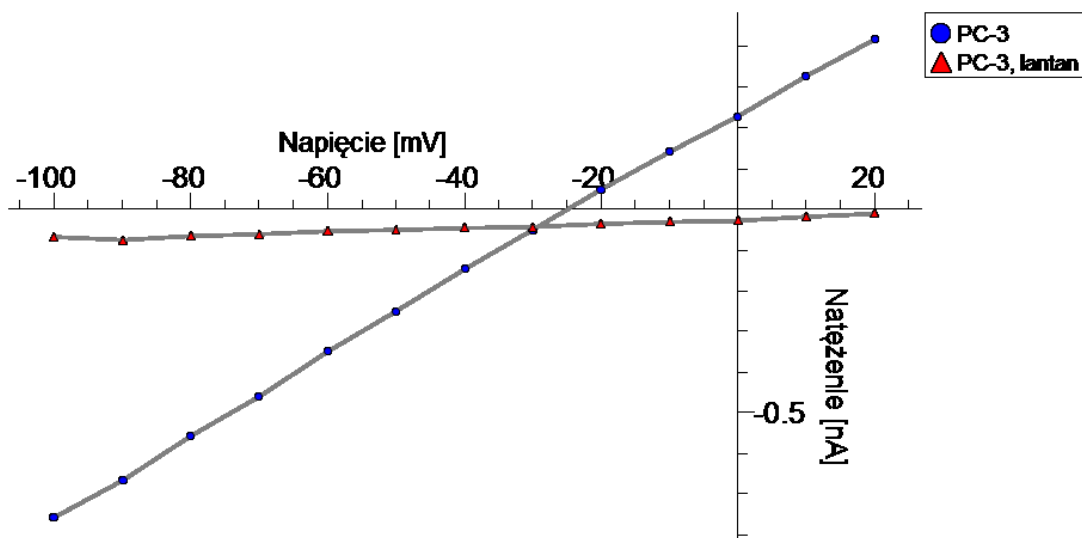


Ryc. 30

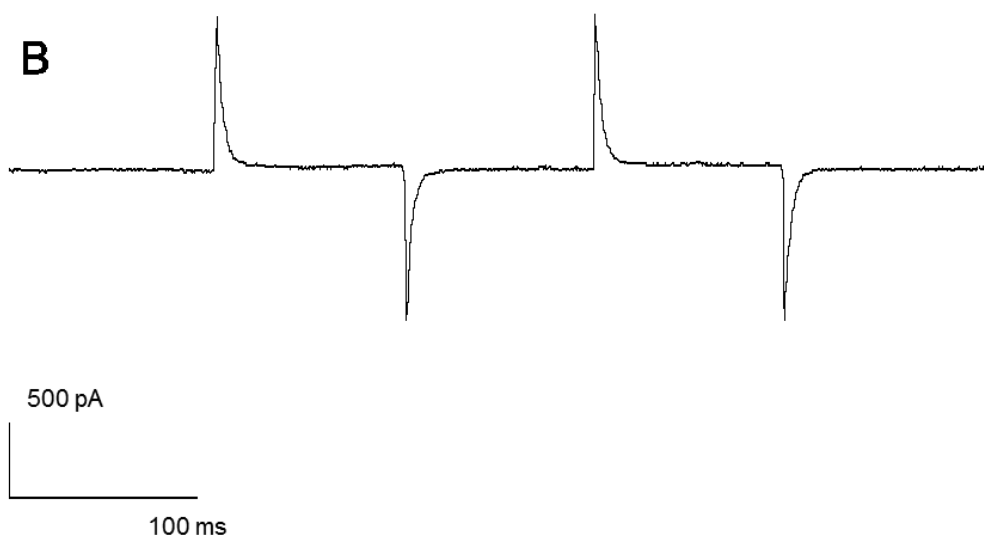
Zapis prądów w roztworze zewnątrzkomórkowym z  $\text{CaCl}_2$  (2 mM) dla przykładowych rejestracji w komórkach linii COLO 205 (A) i PC-3 (B), skala 500 pA, 50 ms. Prądy zarejestrowane bezpośrednio po uzyskaniu konfiguracji „whole-cell” (górny panel) oraz po pojawieniu się prądów liniowych (środkowy panel). Charakterystyka natężenia od napięcia prądu (I/V) dla rejestracji pokazanych powyżej (dolny panel).

Wykazano ponadto, że rejestrowane w komórkach prądy liniowe były całkowicie blokowane przez dodanie inhibitora prądów wapniowych - lantanu ( $\text{LaCl}_3$ , 100-500  $\mu\text{M}$ ) do roztworu zewnątrzkomórkowego. Właściwość tę wykorzystywano dla weryfikacji konfiguracji whole-cell pod koniec doświadczenia. Weryfikacje przeprowadzano rejestrując prądy pojemnościowe przed ich kompensacją na początku doświadczenia oraz na końcu, w obecności lantanu (Ryc. 31).

A



B



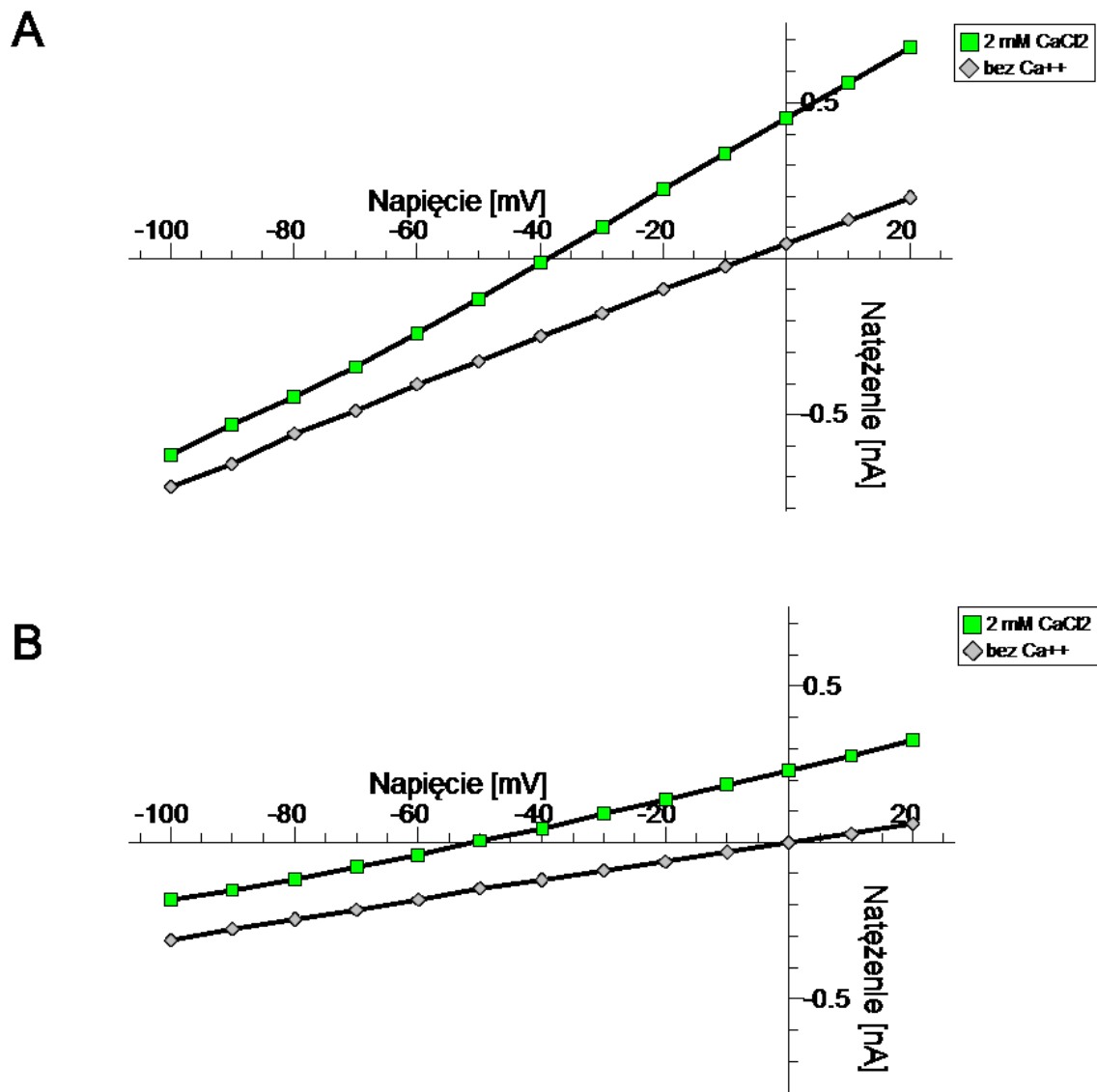
Ryc. 31

Wpływ lantanu ( $\text{LaCl}_3$ ,  $100 \mu\text{M}$ ) na prądy napięciowo-niezależne na przykładzie komórki PC3. **A**, Charakterystyka natężenia od napięcia prądu (I/V) przed i po dodaniu lantanu. **B**, Rejestracja prądów pojemnościowych (bez kompensacji pojemności i oporu dostępu) w obecności lantanu dla udokumentowania konfiguracji „whole-cell” pod koniec rejestracji ( $F = 23 \text{ pF}$ ;  $RS = 12 \text{ M}\Omega$ ).

W dalszej kolejności zbadano zależność obserwowanego prądu od wapnia, poprzez rejestrację prądów w roztworze zewnątrzkomórkowym wolnym od jonów wapnia. Zaobserwowano, iż potencjał odwrócenia rejestrowanych prądów istotnie statystycznie ( $P < 0,05$ ) przesuwa się z wartości ujemnych w stronę wartości bliskich  $0 \text{ mV}$  (Ryc. 32 i 33). Średnia wartość potencjału odwrócenia w roztworze zawierającym  $2 \text{ mM CaCl}_2$  w komórkach COLO 205 wynosiła  $-26,62 \pm 2,88 \text{ mV}$  a w roztworze wolnym od jonów  $\text{Ca}^{2+}$   $-2,16 \pm 1,03 \text{ mV}$ . W komórkach PC-3 natomiast wartość potencjału odwrócenia

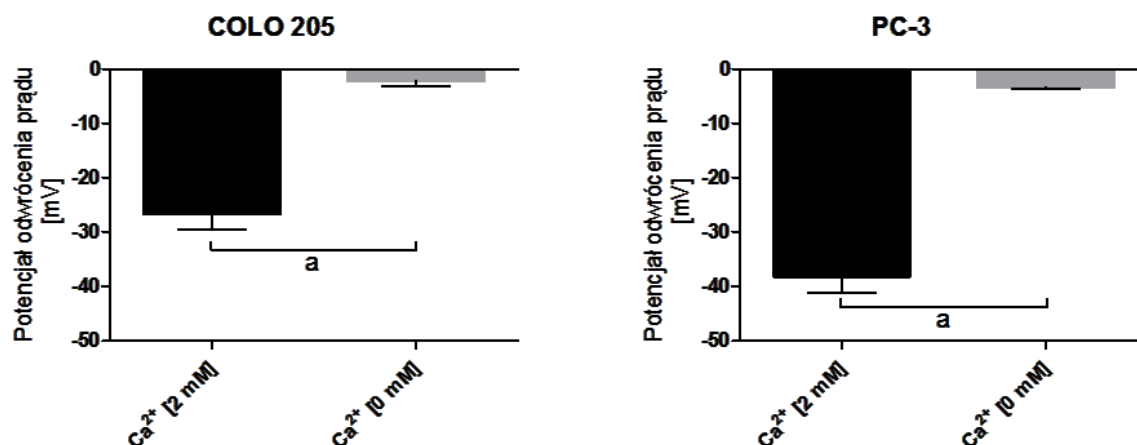
## WYNIKI

w roztworze zawierającym 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  wynosiła  $-38,13 \pm 2,94$  mV a w roztworze wolnym od jonów  $\text{Ca}^{2+}$   $-3,32 \pm 0,41$  mV.



Ryc. 32

Charakterystyka natężenia od napięcia prądu (I/V) dla przykładowych rejestracji prądów w komórkach COLO 205 (A) oraz PC-3 (B) w obecności 2 mM  $\text{CaCl}_2$  oraz w roztworze zewnątrzkomórkowym wolnym od jonów wapnia.

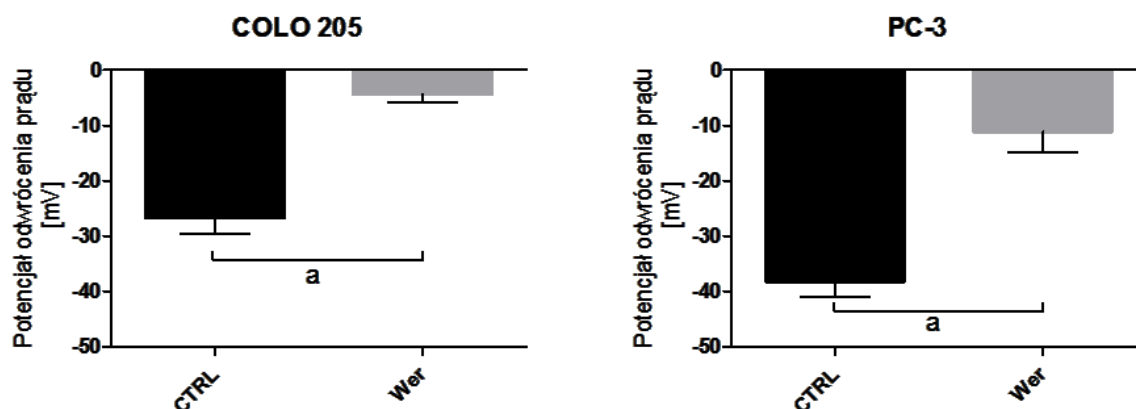


Ryc. 33

Wartości potencjałów odwrócenia prądów rejestrowanych w komórkach COLO 205 oraz PC-3. Słupki reprezentują średnie wartości potencjałów ( $\pm$  SEM) dla prądów rejestrowanych w roztworze zawierającym  $\text{CaCl}_2$  (2 mM) ( $n=18$  dla komórek COLO 205 i  $n=15$  dla komórek PC-3) oraz w roztworze nie zawierającym jonów  $\text{Ca}^{2+}$  ( $n=8$  dla komórek COLO 205 i  $n=6$  dla komórek PC-3). Literą „a” oznaczono różnicę średnich potencjałów odwrócenia istotną statystycznie ( $P<0,05$ ).

### 5.6.3 Wpływ werapamilu na obecne w komórkach COLO 205 i PC-3 prądy napięciowo-niezależne

Werapamil (100  $\mu\text{M}$ ) dodany do roztworu zewnątrzkomórkowego, zawierającego 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , podczas kilkuminutowej rejestracji prądów napięciowo-niezależnych nie wpływał w sposób statystycznie istotny na obserwowane prądy. W dalszej kolejności zbadano wpływ werapamilu zwiększając jego stężenie do 200  $\mu\text{M}$  i wydłużając czas inkubacji (werapamil dodawano do szalki Petriego z hodowanymi komórkami na godzinę przed rejestracją prądów). Zaobserwowano, iż w tych warunkach doświadczenia, werapamil w sposób statystycznie istotny ( $P<0,05$ ) powodował przesunięcie potencjału odwrócenia prądu liniowego w kierunku wartości dodatnich (Ryc. 34). W komórkach COLO 205 średnia wartość potencjału odwrócenia przed dodaniem werapamilu wynosiła  $-26,62 \pm 2,88$  mV a w obecności werapamilu  $-4,33 \pm 1,62$  mV. W tych samych warunkach średnia wartość potencjału odwrócenia w komórkach linii PC-3 wynosiła odpowiednio  $-38,13 \pm 2,94$  mV oraz  $-11,10 \pm 3,71$  mV. Uzyskane zapisy prądów były podobne do obrazów uzyskanych podczas rejestracji prądów w roztworze wolnym od jonów  $\text{Ca}^{2+}$ .



Ryc. 34

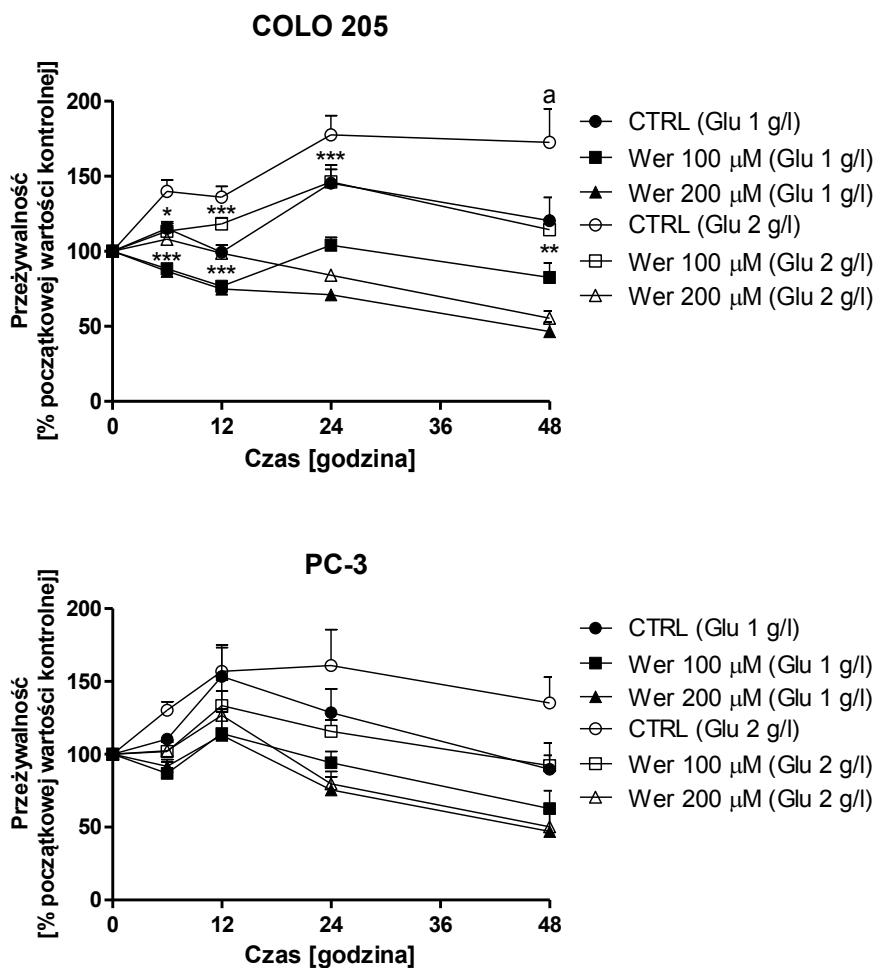
Wpływ werapamilu (Wer, 200  $\mu$ M, 1 godz.) na wartości potencjału odwrócenia prądu w komórkach COLO 205 i PC-3. Słupki reprezentują średnie wartości potencjałów ( $\pm$  SEM) dla prądów rejestrowanych w roztworze bez werapamilu ( $n=18$  dla komórek COLO 205 i  $n=15$  dla komórek PC-3) oraz w roztworze z werapamilem ( $n=3$  dla komórek COLO 205 i  $n=10$  dla komórek PC-3). Literą „a” oznaczono różnicę średnich potencjałów odwrócenia istotną statystycznie ( $P<0,05$ ).

#### 5.7 Wpływ podwyższonego stężenia glukozy w pożywce na cytotoksyczne skutki działania werapamilu w komórkach COLO 205 i PC-3

W celu zweryfikowania alternatywnej hipotezy wyjaśniającej cytotoksyczność werapamilu dla komórek nowotworowych zakładającej hamowanie przez werapamil dokomórkowego transportu glukozy, wykonano pomiar przeżywalności komórek w obecności werapamilu oraz wzrastających stężeń glukozy - 1, 2, 4 g/l (odpowiednio: 5 mM, 10 mM, 20 mM) w pożywce. Przeżywalność komórek COLO 205 (Ryc. 35) hodowanych w pożywce o podwyższonym z 1 g/l do 2 g/l stężeniu glukozy - [CTRL (Glu 2g/l)] wzrosła w 48 godzinie doświadczenia i była statystycznie istotna ( $P<0,05$ ) w stosunku do komórek hodowanych w warunkach kontrolnych - [CTRL (Glu 1g/l)]. Ponadto obniżona pod wpływem werapamilu - [Wer 100  $\mu$ M (Glu 1g/l)] przeżywalność komórek COLO 205 (Ryc. 35 a także Ryc. 7) zwiększała się pod wpływem podwyższonego stężenia glukozy w pożywce - [Wer 100  $\mu$ M (Glu 2g/l)] w stopniu statystycznie istotnym ( $P<0,05$ ), w każdym z porównywanych punktów czasowych (6, 12, 24, 48 godz.) (Ryc. 35). Natomiast żywotność komórek COLO 205 obniżona po zastosowaniu najwyższego użytego stężenia werapamilu - [Wer 200  $\mu$ M (Glu 1g/l)] (Ryc. 35 a także Ryc. 7) zwiększała się po podwyższeniu stężenia glukozy w pożywce - [Wer 200  $\mu$ M (Glu 2g/l)] w sposób bardzo wysoce istotny statystycznie ( $P<0,001$ ) jedynie w 6 i 12 godzinie doświadczenia. Dłuższe

## WYNIKI

czasu inkubacji (24 i 48 godzin) komórek z werapamillem w jego maksymalnym stężeniu - [Wer 200  $\mu\text{M}$  (Glu 2g/l)] zniosły stymulujące przeżywalność działanie glukozy (Ryc. 35). W przypadku przeżywalności komórek PC-3 zaobserwowano podobną zależność między działaniem werapamilu a podwyższonym stężeniem glukozy w pożywce traktowanych werapamillem komórek jednak zaobserwowane różnice nie były statystycznie istotne (Ryc. 35).



Ryc. 35

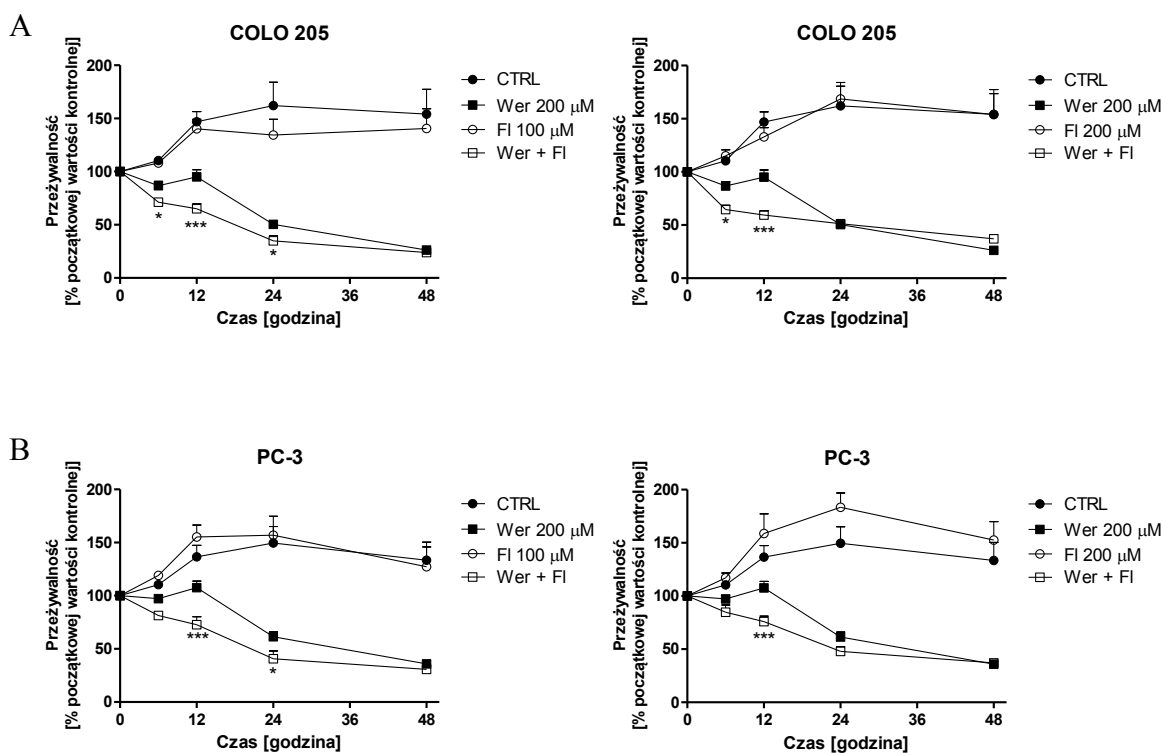
Wpływ glukozy (Glu, 2 g/l) oraz glukozy w obecności werapamilu (Wer, 100, 200  $\mu\text{M}$ ) na przeżywalność linii komórkowych COLO 205 i PC-3 (test MTT). Punkty oznaczają wartości średnie ( $\pm$  SEM) uzyskane z trzech doświadczeń w czterech powtórzeniach. Dla komórek COLO 205, gwiazdkami oznaczono istotności statystyczne (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ) obliczone dla wartości średnich: [Wer (Glu 2 g/l)] vs [Wer (Glu 1 g/l)] w odpowiadających sobie punktach pomiaru czasowego (6, 12, 24, 48 godz.). Literą „a” ( $P < 0,05$ ) oznaczono istotność statystyczną dla wartości średniej w kontroli [CTRL (Glu 2 g/l)] vs [CTRL (Glu 1 g/l)] w 48 godz. doświadczenia.



## WYNIKI

5.8 Próba ustalenia, który z transporterów glukozy może być zaangażowany w zależne od werapamilu blokownie dostępu glukozy komórkom nowotworowym

Aby ustalić, który z transporterów glukozy może być blokowany przez werapamil wykonano testy MTT z zastosowaniem floretyny - inhibitora transporterów glukozy SGLT1, SGLT2 i GLUT2. Floretyna (100, 200  $\mu\text{M}$ ) nie miała wpływu na przeżywalność komórek COLO 205 oraz PC-3. Jednoczesne zastosowanie wysokiego stężenia werapamilu (200  $\mu\text{M}$ ) oraz floretyny (100, 200  $\mu\text{M}$ ) spowodowało natomiast obniżenie żywotności komórek (Ryc. 36). Obserwowany skutek wywołany jednoczesnym użyciem floretyny i werapamilu może sugerować, że werapamil oddziałuje na inny niż podlegający regulacji przez floretynę transporter glukozy.



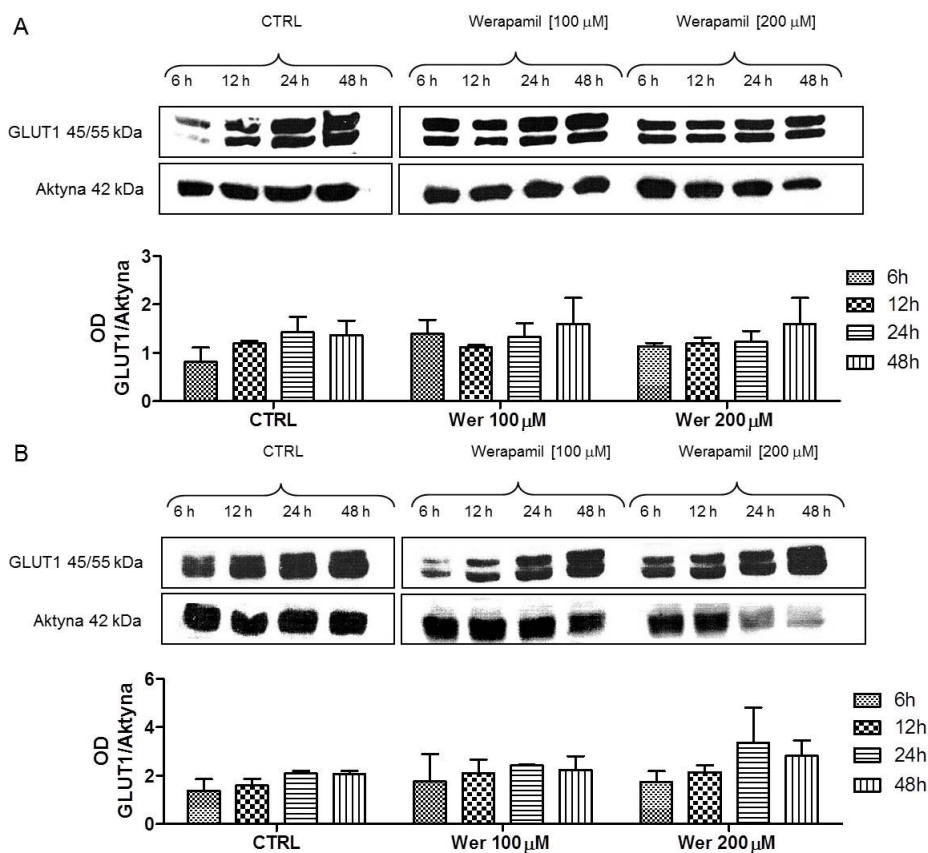
Ryc. 36

Wpływ inhibitora dokomórkowego transportu glukozy – floretyny (FI, 100, 200  $\mu\text{M}$ ) oraz floretyny w obecności werapamilu (Wer, 200  $\mu\text{M}$ ) na przeżywalność komórek COLO 205 (A) i PC-3 (B) (test MTT). Punkty oznaczają wartości średnie ( $\pm$  SEM) uzyskane z trzech doświadczeń w czterech powtórzeniach. Gwiazdkami (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ) oznaczono istotności statystyczne obliczone dla wartości średnich: werapamil + floretyna vs werapamil, w odpowiadających sobie punktach pomiaru czasowego (6, 12, 24, 48 godz.). CTRL – kontrola.

Wykonano również analizę Western blot całokomórkowych lizatów COLO 205 i PC-3 w celu oszacowania ekspresji transportera glukozy GLUT1 (Ryc. 37). Poziom

## WYNIKI

białka GLUT1 nie zmieniał się w stopniu statystycznie istotnym, w porównaniu do kontroli, pod wpływem wzrastających stężeń werapamilu w wybranych czasach inkubacji zarówno w komórkach COLO 205 jak i PC-3.



**Ryc. 37**

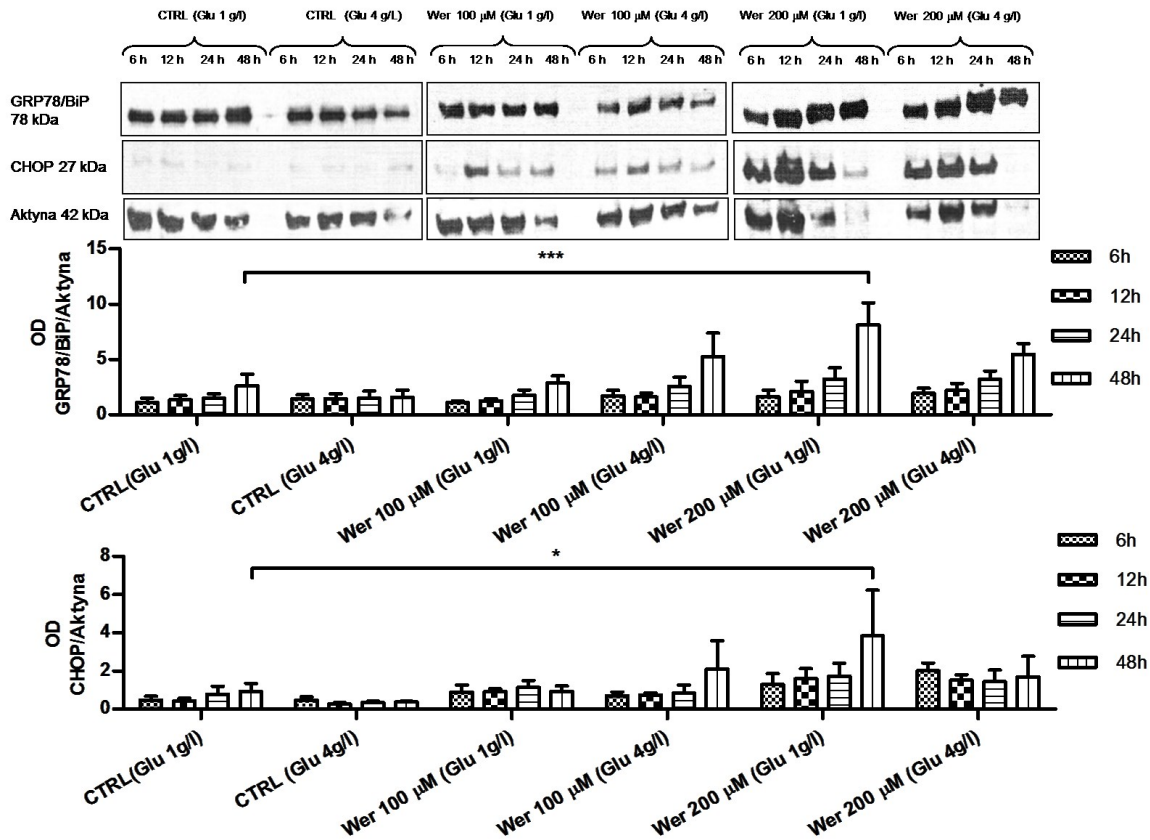
Wpływ wzrastających stężeń inhibitora kanałów wapniowych typu L - werapamilu (Wer, 100, 200 μM) na ekspresję białka GLUT1 w komórkach linii COLO 205 (A) i PC-3 (B). Górne panele prezentują wyniki analizy Western Blot. Przedstawione wykresy (panele dolne) ilustrują współczynniki gęstości optycznej (gęstość optyczna GLUT1 /gęstość optyczna aktyny zastosowanej jako białko odniesienia, OD). Słupki oznaczają wartości średnie ( $\pm$  SEM) uzyskane z trzech doświadczeń przy wielokrotnym powtórzeniu blotów. CTRL – kontrola.

### 5.9 Wpływ werapamilu na białka zaangażowane w regulację stresu siateczki śródplazmatycznej

Zarówno obniżenie cytoplazmatycznej puli jonów wapnia jak i zaburzenia dokomórkowego transportu glukozy mogą mieć negatywny wpływ na procesy dojrzewania białek w obrębie ER co może prowadzić do stresu siateczki, a w konsekwencji odpowiedzi na stres siateczki śródplazmatycznej, do indukcji autofagii. W celu zbadania wpływu werapamilu na indukcję stresu ER, wykonano analizę Western blot całokomórkowych lizatów komórek COLO 205 i PC-3 hodowanych w normalnym (1 g/l) oraz wysokim

## WYNIKI

(4 g/l) stężeniu glukozy, dla białek zaangażowanych w regulację tego procesu – CHOP, GRP78/BiP (Ryc. 38 i 39).



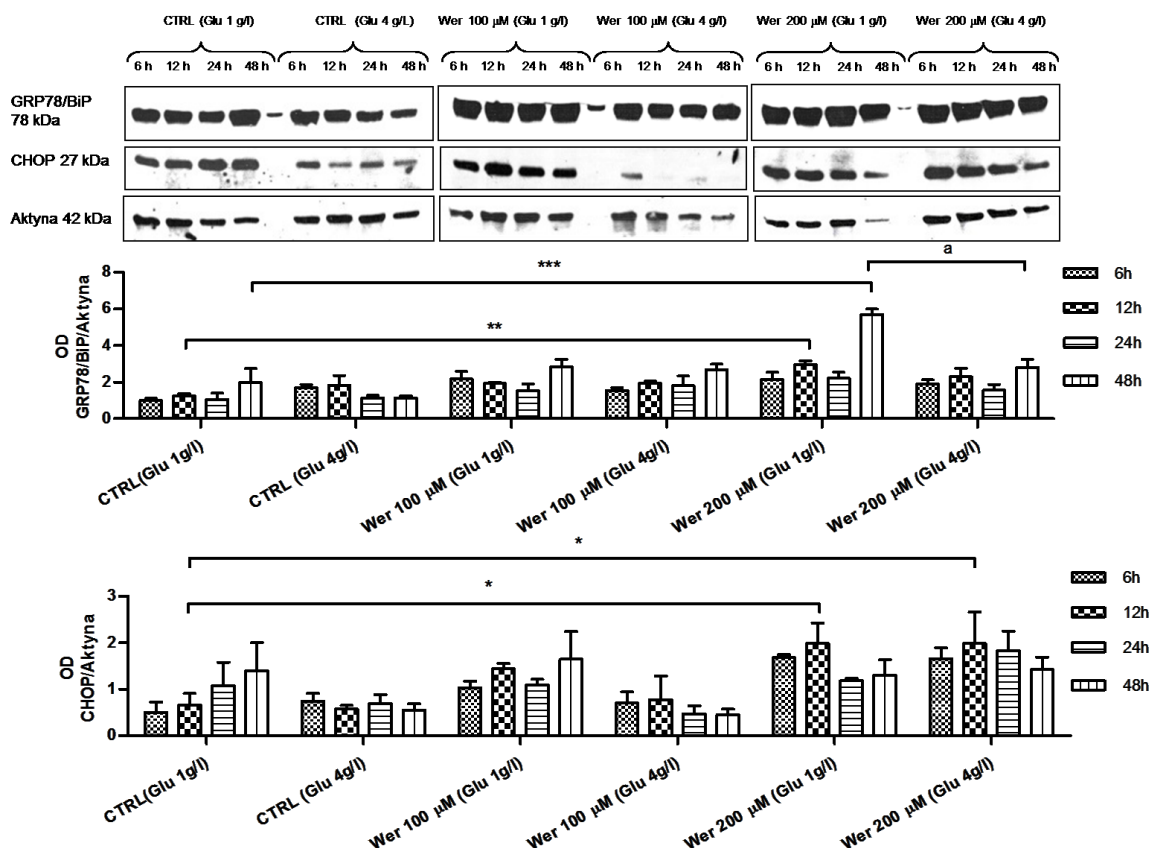
Ryc. 38

Wpływ wzrastających stężeń inhibitora kanałów wapniowych typu L - werapamilu (Wer, 100, 200 μM) w obecności niskiego (1 g/l) lub wysokiego (4 g/l) stężenia glukozy w pożywce, na ekspresję białek CHOP i GRP78/BiP w komórkach linii COLO 205. Górny panel prezentuje wyniki analizy Western Blot. Przedstawione wykresy (panele dolne) ilustrują współczynniki gęstości optycznej (gęstość optyczna badanego białka /gęstość optyczna aktyny zastosowanej jako białko odniesienia, OD). Słupki oznaczają wartości średnie ( $\pm$  SEM) uzyskane z trzech doświadczeń przy wielokrotnym powtórzeniu blotów. Gwiazdkami oznaczono istotności statystyczne (\* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ) obliczone dla wartości średnich: [Wer 200 μM (Glu 1 g/l)] vs [CTRL (Glu 1 g/l)] w 48 godz. doświadczenia. CTRL – kontrola.

Białko GRP78/BiP jest jednym z najważniejszych regulatorów przeżycia komórek i czujników stresu ER kierując nieprawidłowo ukształtowane białka do degradacji, pobudzając wychwytywanie  $Ca^{2+}$  przez ER i nadzorując aktywność błonowych sensorów stresu ER (Luo i Lee 2013), natomiast białko CHOP odpowiada za przekierowanie komórek z drogi przeżycia na szlak programowanej śmierci w sytuacji, gdy autofagia nie przywróci komórce homeostazy (Oyadomari i Mori 2004). Ekspresja białek CHOP i GRP78/BiP w komórkach COLO 205 wykazywała tendencję wzrostową pod wpływem inkubacji z werapamilem w pożywce o niskim stężeniu glukozy - [Wer 200 μM (Glu 1 g/l)]. W tych

## WYNIKI

warunkach, zarówno poziom białka CHOP jak i GRP78/BiP wzrósł w stopniu statystycznie istotnym (przynajmniej  $P < 0,05$ ) w 48 godz. doświadczenia w stosunku do warunków kontrolnych (brak traktowań). Ponadto w komórkach COLO 205 poddanych działaniu werapamilu w pożywce o wysokim stężeniu glukozy - [Wer 200  $\mu\text{M}$  (Glu 4 g/l)] nie zaobserwowano statystycznie istotnego wzrostu poziomu białka CHOP oraz GRP78/BiP w odniesieniu do komórek w układzie kontrolnym - [CTRL (Glu 1 g/l)].



Ryc. 39

Wpływ wzrastających stężeń inhibitora kanałów wapniowych typu L - werapamilu (Wer, 100, 200  $\mu\text{M}$ ) w obecności niskiego (1 g/l) lub wysokiego (4 g/l) stężenia glukozy w pożywce, na ekspresję białek CHOP i GRP78/BiP w komórkach linii PC-3. Górny panel prezentuje wyniki analizy Western Blot. Przedstawione wykresy (panele dolne) ilustrują współczynniki gęstości optycznej (gęstość optyczna badanego białka / gęstość optyczna aktyny zastosowanej jako białko odniesienia, OD). Słupki oznaczają wartości średnie ( $\pm$  SEM) uzyskane z trzech doświadczeń przy wielokrotnym powtórzeniu blotów. Gwiazdkami oznaczono istotności statystyczne (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ) obliczone dla wartości średnich: [Wer 200  $\mu\text{M}$  (Glu 1 g/l)] lub [Wer 200  $\mu\text{M}$  (Glu 4 g/l)] vs [CTRL (Glu 1 g/l)] w odpowiadających sobie punktach pomiaru czasowego (12, 48 godz.); CTRL – kontrola. Literą „a” ( $P < 0,05$ ) oznaczono istotność statystyczną dla wartości średniej: [Wer 200  $\mu\text{M}$  (Glu 1 g/l)] vs [Wer 200  $\mu\text{M}$  (Glu 4 g/l)] w 48 godz. doświadczenia.

W komórkach PC-3 ekspresja GRP78/BiP wzrosła w stopniu statystycznie wysoce istotnym (przynajmniej  $P < 0,01$ ) pod wpływem werapamilu - [Wer 200  $\mu\text{M}$  (Glu 1 g/l)] względem komórek nietraktowanych werapamilem -

[CTRL (Glu 1 g/l)] w 12 oraz 48 godz. doświadczenia (Ryc. 39). Ponadto poziom białka GRP78/BiP obniżył się w stopniu statystycznie istotnym ( $P < 0,05$ ) pod wpływem traktowania komórek PC-3 werapamilem w obecności wysokiego stężenia glukozy w pożywce - [Wer 200  $\mu$ M (Glu 4 g/l)] w stosunku do komórek inkubowanych w tym samym czasie (48 godz.) w pożywce z werapamilem i niskim stężeniem glukozy - [Wer 200  $\mu$ M (Glu 1 g/l)]. Inaczej było w przypadku białka CHOP, którego ekspresja w 12 godz. doświadczenia uległa zwiększeniu w stopniu statystycznie istotnym ( $P < 0,05$ ) pod wpływem działania werapamilu, niezależnie od stężenia glukozy w pożywce doświadczalnej - [Wer 200  $\mu$ M (Glu 1 g/l)] oraz [Wer 200  $\mu$ M (Glu 4 g/l)] (Ryc. 39).

W komórkach COLO 205 i PC-3 sprawdzono również poziom sekrecyjnej formy klasteryny (sCLU) pod wpływem działania wzrastających stężeń werapamilu. Analiza wyników Western blot nie wykazała jednak statystycznie istotnych różnic w ekspresji badanego białka (dane nieprzedstawione).

#### 5.10 Wpływ inhibitora autofagii – chlorochiny na cytotoksyczne działanie werapamilu w komórkach COLO 205

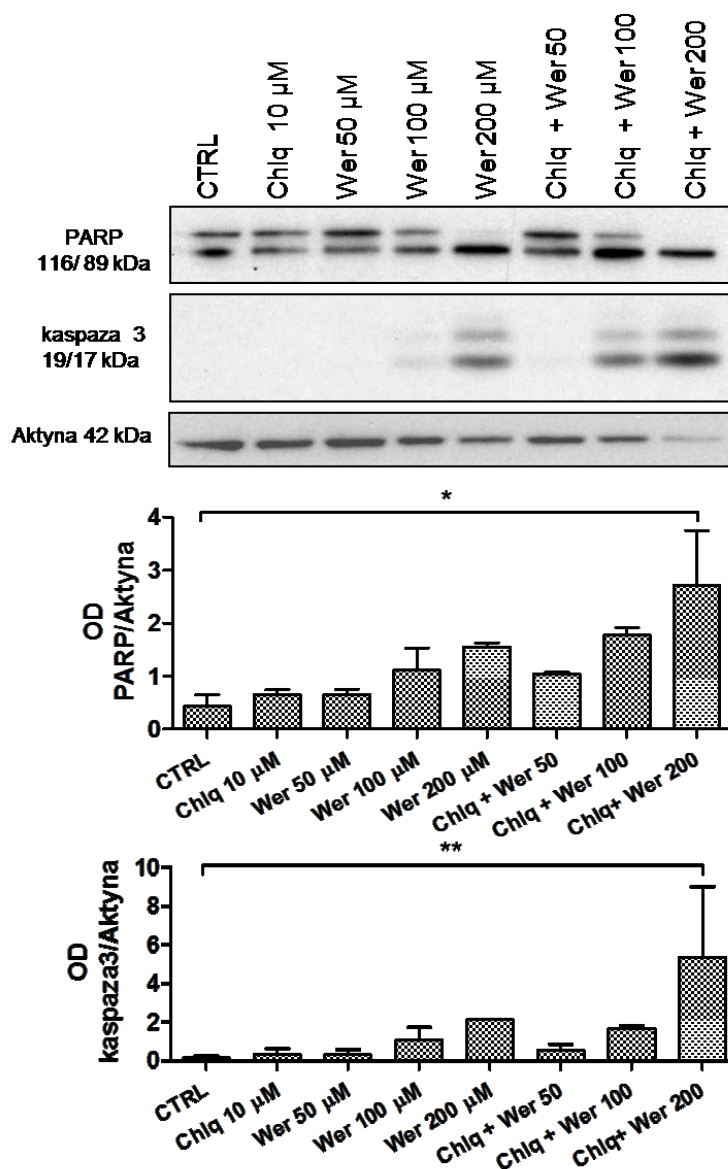
W celu ustalenia udziału autofagii w cytotoksyczności werapamilu wykonano analizę ekspresji formy aktywnej i nieaktywnej polimerazy ADP-rybozy (*poly-ADP ribose polymerase*, PARP) oraz kaspazy 3. Proteolityczne przecięcie kaspazy 3 na podjednostki o ciężarze molekularnym 19 i 17 kDa oznacza jej aktywację a zarazem indukcję zależnej od kaspaz programowanej śmierci komórki. Polimeraza PARP jako enzym o m.c. 116 kDa bierze udział w procesach naprawy DNA w komórce, jednak pod wpływem aktywnej kaspazy 3 ulega proteolitycznemu przekształceniu do formy nieaktywnej o m.c. 89 kDa. Zaobserwowano, że w komórkach COLO 205 zastosowanie werapamilu (200  $\mu$ M) spowodowało po 24 godz. działania widoczne w analizie Western blot podwyższenie ekspresji aktywnej formy kaspazy 3 oraz nieaktywnej formy polimerazy PARP. Wzrost ekspresji markerów programowanej śmierci komórki był statystycznie istotny ( $P < 0,05$ ) w stosunku do kontroli, jeśli wraz z werapamilem (200  $\mu$ M) zastosowano chlorochinę – inhibitor enzymów lizosomalnych, blokujący autofagię na etapie trawienia w obrębie autofagolizosomów (Ryc. 40).

Analiza FACS komórek COLO 205 barwionych jodkiem propidyny (Ryc. 41) wykazała dodatkowo, iż frakcja komórek z pofragmentowanym DNA (frakcja subG<sub>1</sub> na histogramie) świadcząca o indukcji programowanej śmierci komórki, wzrosła w stopniu

## WYNIKI

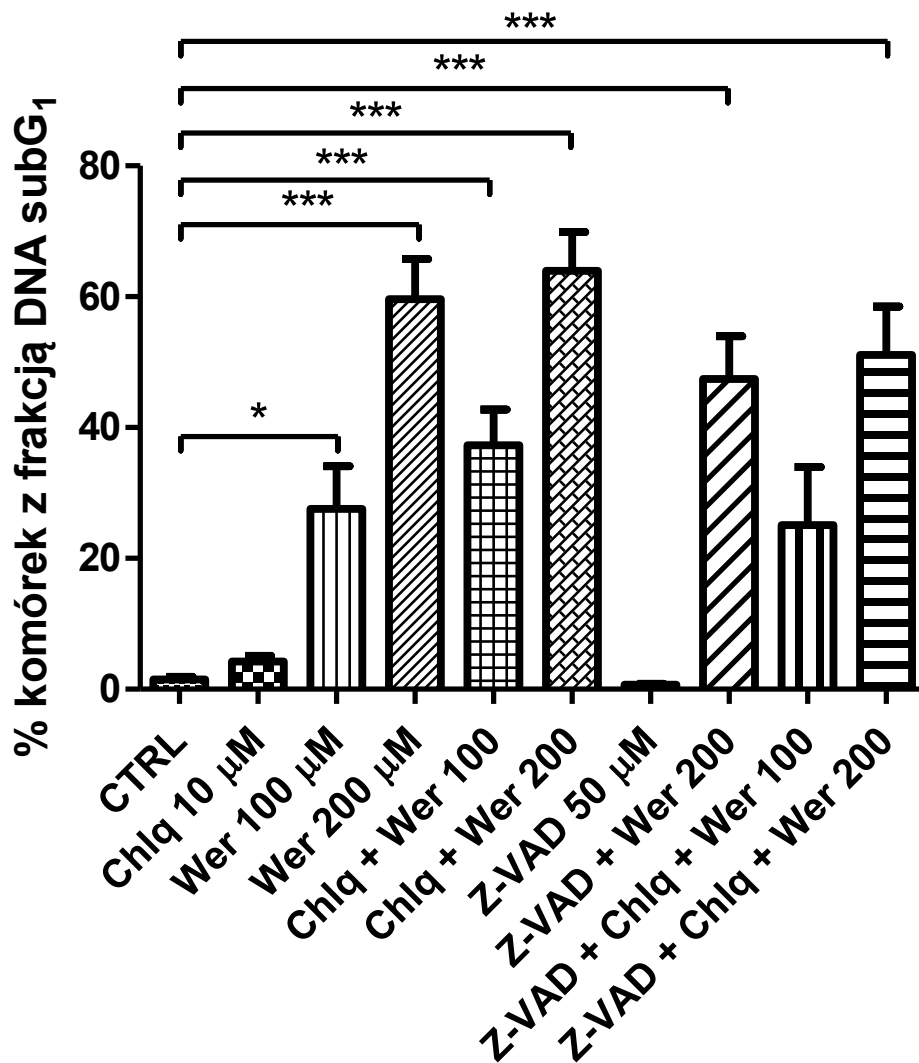
statystycznie istotnym po 24 godz. inkubacji z werapamilem (100, 200  $\mu\text{M}$ ) i wynosiła dla werapamilu (100  $\mu\text{M}$ )  $27,59 \pm 6,54\%$  ( $P < 0,05$ ) a dla werapamilu (200  $\mu\text{M}$ )  $59,60 \pm 6,17\%$  ( $P < 0,01$ ) badanej populacji komórek. Jednoczesne zastosowanie chlorochiny (10  $\mu\text{M}$ ) nasiliło cytotoksyczne działanie werapamilu na komórki linii COLO 205 i wówczas odsetek komórek ulegających programowanej śmierci komórki wynosił  $37,31 \pm 5,44\%$  – dla [Wer 100  $\mu\text{M}$  (Chlq 10  $\mu\text{M}$ )] ( $P < 0,001$ ) oraz  $64 \pm 5,93\%$  dla [Wer 200  $\mu\text{M}$  (Chlq 10  $\mu\text{M}$ )] ( $P < 0,001$ ). Dodatkowo w przypadku komórek poddanych działaniu werapamilu (100  $\mu\text{M}$ ) i chlorochiny, jednoczesne zastosowanie inhibitora aktywacji kaspaz – Z-VAD (50  $\mu\text{M}$ ) obniżyło ilość komórek frakcji subG<sub>1</sub> do  $25,07 \pm 8,91\%$  w stosunku do komórek traktowanych werapamilem i chlorochiną [Wer 100  $\mu\text{M}$  (Chlq 10  $\mu\text{M}$ )] i nie było różne w stopniu statystycznie istotnym od komórek kontrolnych (CTRL, brak traktowań). Może to świadczyć o indukcji zależnej od aktywacji kaspaz apoptozy w komórkach COLO 205 wywołanej jednoczesnym zastosowaniem induktora autofagii – werapamilu oraz inhibitora autofagii – chlorochiny.

## WYNIKI



Ryc. 40

Wpływ inhibitora autofagii – chlorochiny (Chlq 10 μM) w obecności wzrastających stężeń inhibitora kanałów wapniowych typu L - werapamilu (Wer, 100, 200 μM), na ekspresję białka PARP oraz kaspazy 3 w komórkach linii COLO 205, po 24 godz. inkubacji. Górny panel prezentuje wyniki analizy Western Blot. Przedstawione wykresy (panele dolne) ilustrują współczynniki gęstości optycznej (gęstość optyczna badanego białka /gęstość optyczna aktyny zastosowanej jako białko odniesienia, OD). Słupki oznaczają wartości średnie (± SEM) uzyskane z trzech doświadczeń przy wielokrotnym powtórzeniu blotów. Gwiazdkami oznaczono istotności statystyczne (\*P<0,05;\*\*P<0,01) obliczone dla wartości średnich: Chlq 10 μM + Wer 200 μM vs CTRL (kontrola).



Ryc. 41

Wpływ wzrastających stężeń inhibitora kanałów wapniowych typu L - werapamilu (Wer, 100, 200  $\mu\text{M}$ ) w obecności inhibitora autofagii – chlorochiny (Chlq 10  $\mu\text{M}$ ) oraz inhibitora aktywacji kaspaz – Z-VAD (50  $\mu\text{M}$ ), na indukcję programowanej śmierci komórki w komórkach linii COLO 205, po 24 godz. inkubacji. Słupki oznaczają wartości średnie ( $\pm$  SEM) uzyskane z trzech doświadczeń w trzech powtórzeniach. Gwiazdkami oznaczono istotności statystyczne (\* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ) obliczone dla wartości średnich różniących się od kontroli (CTRL).



**6. Podsumowanie wyników**

1. Werapamil obniżył przeżywalność (test MTT) oraz proliferację (test z fioletem krystalicznym) komórek COLO 205, PC-3 oraz, w mniejszym stopniu, również komórek PNT-2.
2. Werapamil wywołał autofagię w komórkach COLO 205, PC-3 oraz, w mniejszym stopniu i dłuższym czasie działania, także w komórkach PNT-2. Indukowana werapamilem autofagia została potwierdzona na podstawie badań ultrastrukturalnych (TEM) oraz oceny akumulacji białka MAP LC3-II.
3. Obecność werapamilu nie zmieniła ekspresji typowych dla autofagii białek: Bekliny1, Vps34, Bcl-2 w komórkach COLO 205 i PC-3.
4. Wewnątrzkomórkowa pula jonów  $Ca^{2+}$  (test z FURA<sub>2</sub>) uległa obniżeniu pod wpływem werapamilu w komórkach COLO 205 i PC-3, lecz nie w komórkach PNT-2. Wpływ nifedypiny w tych samych warunkach był znikomy.
5. Analiza patch-clamp nie wykazała indukcji napięciowo-zależnych prądów wapniowych w komórkach COLO 205 oraz PC-3. W komórkach obecne były jednak liniowe prądy, których charakterystyka była zależna od jonów  $Ca^{2+}$ , lantanu i werapamilu.
6. Zastosowanie podwyższonego stężenia glukozy w pożywkach doświadczalnych znosiło cytotoksyczne działanie werapamilu (test MTT) w komórkach COLO 205. Efekt ten był mniej widoczny w komórkach linii PC-3.
7. Werapamil powodował wzmożoną ekspresję białek typowych dla indukcji stresu siateczki śródplazmatycznej – GRP78/BiP i CHOP. Podwyższona ekspresja GRP78/BiB oraz CHOP (z wyjątkiem białka CHOP w komórkach PC-3) nie była widoczna gdy werapamil był stosowany wraz z wyższym stężeniem glukozy w pożywce (4 g/l). Dodatkowo, obecność werapamilu prowadziła do zmian patologicznych w obrębie ER w obrazie ultrastrukturalnym komórek COLO 205 i PC-3.
8. Jednoczesne zastosowanie induktora autofagii – werapamilu oraz inhibitora autofagii – chlorochiny spowodowało silniejszą ekspresję białek markerowych dla

## PODSUMOWANIE WYNIKÓW

apoptozy – aktywnej kaspazy 3 oraz nieaktywnej formy PARP. Dodatkowo analiza FACS wykazała zależność indukowanej programowanej śmierci komórki od obecności inhibitora kaspaz – Z-VAD.

## 7. Dyskusja

Cytotoksyczne właściwości werapamilu w stosunku do komórek nowotworowych były opisywane w literaturze już w latach 90-tych ubiegłego wieku. Po jednoczesnym zastosowaniu hipertermii i werapamilu w badaniach *in vitro* (Shchepotin i wsp., 1997) oraz *in vivo* (Shchepotin i wsp., 1997) autorzy obserwowali apoptozę w komórkach raka jelita grubego linii HT-29. Werapamil (100  $\mu$ M) hamował także proliferację i indukował apoptozę w komórkach raka jelita grubego linii HCT (Cao i wsp., 2005).

W przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej badaniach *in vitro* dodanie do pożywki hodowlanej werapamilu wywołało w komórkach wybranych linii nowotworowych (gruczolakoraka okrężnicy linii COLO 205 oraz raka stercza linii PC-3) skutki cytotoksyczne objawiające się obniżoną przeżywalnością i proliferacją (Ryc. 7 i 8). Natomiast w przypadku wykorzystanych w badaniach nie nowotworowych komórek stercza linii PNT-2, wpływ werapamilu na obniżenie przeżywalności i proliferacji komórek w tych samych warunkach doświadczalnych był słabszy (Ryc. 9).

Z danych literaturowych wynika, że najczęściej opisywaną właściwością werapamilu, wpływającą negatywnie na przeżycie komórek nowotworowych, jest jego zdolność do blokowania pomp białkowych odpowiedzialnych za reakcje oporności wielolekowej (*MDR, multidrug resistance*). Wymienioną właściwość wykorzystano w badaniach *in vivo* wykorzystując werapamil do wzmocnienia efektów leczenia raka wątroby chemioterapeutykami. Werapamil był w tym modelu doświadczalnym podawany bezpośrednio do tętnicy wątrobowej psów, nie powodując ubocznych skutków obwodowych w układzie sercowo-naczyniowym (Pingsheng i wsp., 2012). Wykazano także, że werapamil i jego pochodna NMeOH<sub>2</sub> zdolne są do indukowania apoptozy poprzez usuwanie zredukowanego glutationu (GSH) w komórkach posiadających błonowy transporter MRP-1 (*multidrug resistance protein-1*) (Trompier i wsp., 2004). W innych badaniach wskazano na rolę werapamilu w hamowaniu aktywności glikoproteiny P (P-gp) i zwiększaniu w ten sposób skuteczności terapii przeciwnowotworowej (Tcherniuk i Oleinikov, 2015). Wykorzystane w wykonanych przeze mnie badaniach komórki linii PC-3 oraz COLO 205 nie wykazują jednak obecności białka P-gp (Sanchez i wsp., 2009; Ugocsai i wsp., 2005), choć zaobserwowano podwyższenie ekspresji białka MRP-1 pod wpływem związków siarki w komórkach COLO 205 (Lai i wsp., 2012). Brak białka P-gp i wynikająca stąd zdolność komórek COLO 205 do gromadzenia ksenobiotyków jest

rutynowo wykorzystywana jako tzw. kontrola pozytywna w badaniach nad przełamaniem lekooporności w komórkach nowotworowych (Spengler i wsp., 2011).

Główną funkcją autofagii jest podtrzymywanie zrównoważonego bilansu energetycznego komórki i zapobieganie uszkodzeniom wynikającym z ekspozycji na czynniki indukujące stres komórkowy. Komórki nowotworowe często wykorzystują autofagię jako mechanizm chroniący je przed działaniem leków przeciwnowotworowych i w tym celu nasilają ten proces w sytuacjach zagrożenia np. podczas leczenia chemioterapeutykami (Macintosh i Ryan, 2013). Werapamil indukował autofagię w komórkach COLO 205, PC-3 oraz w dużo mniejszym stopniu w PNT-2, obserwowaną na poziomie ultrastrukturalnym i molekularnym (Ryc. 10 – 15, 19 – 21). W przypadku komórek COLO 205 i PC-3 werapamil wywoływał autofagię już po 6 godz. inkubacji, ocenioną na podstawie względnego poziomu ekspresji białka MAP LC3-II w komórkach (Ryc. 20) a także przekształcenia cytozolowego białka MAP LC3-I w formę MAP LC3-II związaną z błoną autofagosomów (Ryc. 19). Nagromadzenie białka MAP LC3-II sprzężonego z białkiem zielonej fluorescencji, obserwowane w mikroskopie konfokalnym w postaci świecących punktów jest typowym zjawiskiem zachodzącym podczas autofagii. Metodę tę wykorzystano w ocenie aktywności znanych modulatorów autofagii tj. rapamycyny czy bafilomycyny A (Ramirez-Peinado i wsp., 2013). Innym narzędziem rutynowo wykorzystywanym w badaniach dotyczących autofagii jest mikroskopia elektronowa. Technika ta, mimo iż wymaga dużego nakładu pracy, jest ogromnie pomocna w analizowaniu zjawisk zachodzących w komórce i przez wielu badaczy autofagii uważana za tzw. „złoty standard” (Ozpolat i Benbrook, 2015). Inkubacja komórek COLO 205 oraz PC-3 z werapamilem (6-24 godz.) wykazała w obrazie morfologii komórek obecność typowych dla autofagii struktur – wczesnych i późnych wakuol autofagowych, (Ryc. 13, 14). Podobne struktury obserwowano podczas autofagii indukowanej głodem oraz pod wpływem werapamilu (Orvedahl i wsp., 2011; Pająk i wsp., 2012). W komórkach PNT-2 nie zaobserwowano wzmożonej ekspresji białka MAP LC3-II, świadczącej o akumulacji autofagosomów nawet po 24 godz. inkubacji z werapamilem (Ryc. 21). Autofagia w obrazie ultrastrukturalnym była jednak widoczna po 24 godz. działania czynnika i charakteryzowała się przewagą wczesnych struktur autofagowych (Ryc. 15). Werapamil był już opisywany jako czynnik indukujący autofagię w komórkach nowotworowych (Ahn i wsp., 2012; Meister i wsp. 2010) a także w komórkach normalnych (Park i wsp., 2014). Istnieją również doniesienia zaliczające werapamil do

grupy związków amfifilowych (*cationic amphiphilic drugs*), które mogą dyfundować przez błonę do wnętrza lizosomów i podwyższać ich pH, co w konsekwencji może prowadzić do inaktywacji hydrolaz lizosomalnych oraz blokowania połączenia lizosomów z autofagosomami i na tej drodze hamować proces autofagii (Kondratskyi i wsp., 2013). W badaniach nad autofagią kluczowym zagadnieniem pozostaje ustalenie czy proces ten nasila się, czy ulega zahamowaniu pod wpływem badanego czynnika. Z uwagi na fakt, że w obu sytuacjach dochodzi w komórkach do podwyższenia liczebności autofagosomów (w pierwszym przypadku z powodu nasilenia się procesu ich formowania, zaś w drugim z powodu zatrzymania procesu fuzjowania z lizosomami), rozstrzygające dla oceny są wyniki badań dynamicznych określanych mianem „przepływu autofagalnego” (*autophagy flux*). W przypadku komórek COLO 205 oraz PC-3 ekspresja białka MAP LC3-II, znanego markera autofagosomów, okazała się wyższa w obecności werapamilu niż w obecności E64d i pepstatyny A (inhibitory proteaz lizosomalnych) (Ryc. 20), które powodują gromadzenie się autofagosomów w wyniku zahamowania autofagii na etapie degradacji lizosomalnej. W testowanych liniach komórkowych werapamil pełnił więc funkcję induktora autofagii, gdyby bowiem jego zastosowanie prowadziło do zablokowania autofagii, ekspresja MAP LC3-II nie różniłaby się od tej jaką obserwowano pod wpływem E64d i pepstatyny A. Prowadzone w ten sposób badania nad aktywnością procesu autofagii opisali wcześniej Wilkinson i wsp., 2011. Dodatkowo analiza ultrastrukturalna badanych przez mnie komórek nowotworowych (Ryc. 13 i 14) wykazała obecność struktur charakterystycznych zarówno dla wczesnych jak i końcowych etapów autofagii, co świadczy o pełnym i kompletnym przebiegu tego procesu pod wpływem działania werapamilu.

W molekularnym mechanizmie indukcji autofagii istotną rolę odgrywają kompleksy białkowe złożone m.in. z Bekliny 1 i Vps34, białek biorących udział w formowaniu autofagosomu (Miao i wsp., 2013; Ozpolat i Benbrook, 2015). W komórkach COLO 205 i PC-3 poddanych działaniu werapamilu, nie zaobserwowano zmian w ekspresji Bekliny 1 i Vps34 (Ryc. 22 i 23). Przeprowadzone badania nie wykazały również zmian poziomu białka Bcl-2, które według danych literaturowych tworzy kompleksy z Bekliną 1, hamując w ten sposób jej funkcję (Ozpolat i Benbrook, 2015). Możliwe jest jednak, iż Beklina 1, Vps34 czy Bcl-2 biorą udział w indukowanej werapamilem autofagii w komórkach COLO 205 i PC-3, jednakże pozostaje to bez wpływu na ich ekspresję a zmiana aktywności białek jest modulowana przez ich

fosforylację/defosforylację lub interakcje z innymi komponentami formowanych kompleksów białkowych. Istnieje także możliwość, iż autofagia obserwowana w badanych komórkach nowotworowych pod wpływem werapamilu zachodzi bez udziału Bekliny 1, tak jak np. w przypadku autofagii indukowanej karnozolem w potrójnie negatywnym modelu komórkowym raka piersi (Al Dhaheri i wsp., 2014). Autorzy wymienionej pracy sugerują ponadto, iż niezależność procesu autofagii od Bekliny 1 może być związana ze stymulującą programowaną śmierć komórki rolą autofagii (Al Dhaheri i wsp., 2014).

Werapamil znany jest głównie z redukcji wewnątrzkomórkowej puli jonów wapnia na drodze blokowania błonowych kanałów wapniowych napięciowo-zależnych typu L oraz T. Obecność kanałów wapniowych typu L wykazano w pierwotnych liniach komórkowych raka jelita grubego (Zawadzki i wsp., 2008) a także w dostępnych komercyjnie liniach komórkowych HT-29, Caco-2 i T84 (Wang i wsp., 2000). Ekspresja kanałów wapniowych typu T była natomiast pobudzana w komórkach PC-3 pod wpływem hormonu peptydowego – greliny (Díaz-Lezama i wsp., 2010). Ponadto napływ jonów  $Ca^{2+}$  do wnętrza komórek PC-3, obserwowany po zastosowaniu agonisty kanałów wapniowych BayK 8644, mógł być spowodowany pobudzeniem kanałów typu T lub wapniowych kanałów aktywowanych pojemnościowo (Lai i wsp., 2013). W komórkach raka prostaty nie obserwowano natomiast napięciowo-zależnych kanałów wapniowych typu L (Shapovalov i wsp., 2013).

W przeprowadzonych w ramach dysertacji badaniach, nifedypina – swoisty inhibitor kanałów wapniowych typu L, zastosowana w identycznych stężeniach molarnych co werapamil, nie obniżała przeżywalności komórek linii COLO 205, PC-3 i PNT-2 (Ryc. 25) a proliferację komórek upośledzała jedynie zastosowana w najwyższym badanym stężeniu (Nif 200  $\mu$ M) w 48 godz. doświadczenia w komórkach PC-3 (Ryc. 26). Nifedypina zastosowana razem z werapamilem, wzmocniła również jego cytotoksyczne skutki w komórkach PC-3 (Ryc. 28). Dodatkowo nifedypina w statystycznie istotnym stopniu ( $P < 0,05$ ) obniżyła wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia w komórkach COLO 205, pomimo że nie miała wpływu na jego stężenie w komórkach PC-3 ani w komórkach PNT-2 (Ryc. 29). Werapamil obniżał z kolei znacząco stężenie  $Ca^{2+}$  w komórkach linii nowotworowych ( $P < 0,001$ ), pozostając bez wpływu na pulę  $Ca^{2+}$  w referencyjnych komórkach linii PNT-2 ( $P > 0,05$ ). Uzyskane wyniki świadczą o tym, że cytotoksyczność werapamilu może wynikać z innych właściwości tego związku niż hamowanie napływu jonów wapnia do komórek. Zawadzki i wsp. (2008) opisali

apoptozę komórek w hodowli pierwotnej komórek raka jelita grubego indukowaną przez BayK 8644. W przedstawionych przez autorów niniejszej pracy wynikach badań preinkubacja z werapamilem chroniła komórki przed napływem jonów wapnia i wywołaniem apoptozy przez BayK 8644.

Ponieważ zastosowanie związków należących do grupy inhibitorów napięciowozależnych kanałów wapniowych – werapamilu i niefedypiny, miało zróżnicowany wpływ na poziom wapnia w cytoplazmie badanych komórek, istnieje przypuszczenie, iż werapamil moduluje dostępność jonów  $\text{Ca}^{2+}$  dla komórek poprzez regulację aktywności innych kanałów wapniowych niż zależne od napięcia kanały wapniowe typu L i T. Badania wykonane techniką patch-clamp nie wykazały obecności napięciowo-zależnych kanałów wapniowych w komórkach COLO 205 i PC-3. W badanych komórkach nowotworowych obserwowano natomiast zależny od wapnia prąd liniowy, który może świadczyć o obecności innych niż napięciowo-zależne, kanałów przepuszczalnych dla  $\text{Ca}^{2+}$  (Ryc. 30-32). Cechą charakterystyczną obserwowanego prądu jest zależność potencjału odwrócenia od obecności wapnia w roztworze zewnątrzkomórkowym (Ryc. 32 i 33). Wydaje się, że zmiana potencjału odwrócenia może wynikać z takich zjawisk jak gromadzenie jonów czy zmiana przewodnictwa kanału. Zmianę przewodnictwa obserwowano np. dla niektórych kanałów TRP (Chung i wsp., 2005, Munns i wsp., 2015), także takich, jakie są obecne w komórkach PC-3 (np. kanały TRPV3, Firlej i wsp., 2011) i takich które posiadają liniową charakterystykę I/V (Chung i wsp., 2005). Przesunięcie potencjału odwrócenia obserwowano także w obecności werapamilu zarówno podczas rejestracji prądów w komórkach COLO 205 jak i PC-3 (Ryc. 34). Z uwagi na fakt, iż komórki nowotworowe PC-3 posiadają różne kanały TRP (Shapovalov i wsp., 2013), nie można wykluczyć, że część rejestrowanych prądów jest wynikiem aktywności tych kanałów. Pochodzenie i geneza obserwowanych w komórkach COLO 205 i PC-3 prądów zależnych od wapnia powinny być jednak zweryfikowane przy zastosowaniu specyficznych modulatorów kanałów TRP np. 2APB (Colton i Zhu, 2007). Taka weryfikacja jest zasadna z uwagi na fakt, iż zastosowany w doświadczeniach na komórkach COLO 205 i PC-3 lantan nie jest specyficznym inhibitorem kanałów TRP. W badaniach wykonywanych techniką patch-clamp, lantan może być stosowany zarówno jako inhibitor kanałów wapniowych (TRP oraz napięciowo-zależnych) jak i prądów przeciekowych, nieselektywnych dla wapnia (Boone i wsp., 2014). Nie można więc wykluczyć, iż prądy obserwowane w komórkach COLO 205 i PC-3 mają składową

pochodzącą z przeciekowego prądu złącza komórka-pipeta. Prądy takie są blokowane przez lantan, są przewodnie dla jonów Cs i NMDG oraz są blokowane przez werapamil (Boone i wsp., 2014). Autorzy wymienionej pracy sugerują jednak, że rozszczelnienia połączeń pomiędzy pipetą a komórką nie umożliwiają dyfuzji jonów wapnia. Choć prądy obserwowane w komórkach COLO 205 i PC-3 były zależne od obecności jonów wapnia, ustalenie udziału komponent wapniowej i przeciekowej w rejestrowanych prądach wymaga dalszych badań.

Do nieswoistych farmakologicznych właściwości werapamilu należy jego zdolność do hamowania dokomórkowego transportu glukozy. W prezentowanych badaniach, podwyższenie stężenia glukozy z 1g/l do 2 lub 4g/l w pożywce znosiło cytotoksyczność werapamilu (Ryc. 35), co może świadczyć o zależnym od glukozy mechanizmie cytotoksyczności werapamilu dla komórek COLO 205 i PC-3. Glukoza podwyższyła przeżywalność komórek nowotworowych, a werapamil w wyższym z zastosowanych stężeń (200  $\mu$ M) efekt ten znosił i odwrotnie, kiedy werapamil użyty w stężeniu 100  $\mu$ M obniżył przeżywalność komórek w warunkach naśladujących stan normoglikemii (1 g/l), podwojenie stężenia glukozy do 2 g/l przywróciło obniżoną przez werapamil przeżywalność komórek (Ryc. 35). Wykonano dodatkowe badania z użyciem floretyny, która hamuje aktywność transporterów glukozy SGLT1, SGLT2 i GLUT2. Wiadomo, iż mRNA transportera GLUT2 jest obecne w komórkach COLO 205 na niskim poziomie (Yang i wsp., 2009). Z kolei w nowotworach stercza, w tym także w komórkach linii PC-3 opisano wzmożoną ekspresję kotransportera SGLT1 (Blessing i wsp., 2012). W przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej badaniach, w przeciwieństwie do werapamilu (200  $\mu$ M), który znacząco hamował przeżycie komórek, floretyna nawet w stężeniu 200  $\mu$ M nie miała istotnego wpływu na przeżycie komórek COLO 205 i PC-3 (Ryc. 36). Jednoczesne użycie floretyny i werapamilu w statystycznie istotnym stopniu ( $P < 0.01$ ) obniżyło jednak przeżywalność badanych komórek nowotworowych (Ryc. 36). Z zebranych obserwacji wynika, że SGLT1, SGLT2 i GLUT2 nie odgrywają istotnej roli w przeżyciu komórek badanych linii nowotworowych w warunkach kontrolnych (brak werapamilu w pożywce), natomiast pogłębienie przez floretynę cytotoksyczności werapamilu może wskazywać na synergizm działania wymienionych substancji. Może to sugerować, iż werapamil oddziałuje na inne niż floretyna transportery glukozy, jak również, że to właśnie transportery regulowane przez werapamil są kluczowe dla przeżycia komórek COLO 205 i PC-3. Przyniesione wyniki badań potwierdzają wcześniejsze



obserwacje innych autorów (Strigun i wsp., 2011), którzy wykazali, iż werapamil obniżał wychwytywanie glukozy przez mysie komórki HL-1. Ponadto wg. wymienionych autorów zastosowanie werapamilu w doświadczeniach na komórkach nowotworowych spowodowało znaczące zmiany w aktywności głównych szlaków metabolicznych komórek. Pomimo, że wydajność cyklu kwasów trójkarboksylowych w komórkach nowotworowych poddanych działaniu werapamilu nie uległa znaczącej zmianie w stosunku do komórek kontrolnych, pod jego wpływem zaobserwowano obniżoną wydajność procesu glikolizy oraz zmniejszoną produkcję kwasu mlekowego, co może wyjaśnić genzę potencjalnie przeciwnowotworowego działania werapamilu (Strigun i wsp., 2011). W fibroblastach linii L929 posiadających transporter glukozy GLUT1 odpowiedzialny za dokomórkowy transport glukozy na poziomie podstawowym oraz w warunkach zwiększonego na nią zapotrzebowania np. podczas stresu wywołanego głodem komórek, zastosowanie w pożywce werapamilu spowodowało obniżenie dokomórkowego transportu 2-DG. Wykazano ponadto, że cytotoksyczne skutki działania werapamilu na komórki w pożywce o normalnej zawartości glukozy jak i od niej wolnej (stres głodzenia) nie były zależne od sygnału wapniowego (Louters i wsp., 2010). Wiadomo, że zarówno komórki COLO 205 jak i PC-3 posiadają transporter GLUT1 (Tagnebratt i wsp., 2013), potwierdziła to również analiza Western blot całokomórkowych lizatów COLO 205 i PC-3 (Ryc. 37).

Zmiany w wewnątrzkomórkowym rozmieszczeniu jonów wapnia oraz ograniczona dostępność glukozy mogą razem prowadzić do zaburzeń procesu formowania i dojrzewania białek, a to z kolei może wywoływać stres siateczki śródplazmatycznej (Kania i wsp., 2015). Stres ER objawia się wówczas m.in. zwiększoną ekspresją białek opiekuńczych (czaperonów) obecnych w siateczce endoplazmatycznej tj. GRP78/BiP a także czynnika transkrypcyjnego CHOP, który odgrywa jedną z podstawowych ról w indukcji apoptozy (Zhang i wsp., 2013). Ekspresja wymienionych i innych białek o podstawowym znaczeniu dla przeżycia została prześledzona w komórkach wybranych linii poddanych działaniu werapamilu. Wyniki półilościowej analizy ekspresji białek decydujących o aktywności metabolicznej, natężeniu autofagii i apoptozy ukazują złożony charakter zależności zachodzących pomiędzy nimi. W oparciu o wyniki badań Western blot zebranych z doświadczeń nad wpływem glukozy (1 g/l v. 4 g/l) i werapamilu (100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M) na ekspresję białek GRP78/BiP i CHOP można stwierdzić, że werapamil podwyższał znacząco ekspresję obydwu białek w komórkach linii COLO 205 i PC-3

(Ryc. 38 i 39). Glukoza w wyższym stężeniu (4 g/l) zapobiegała zależnemu od werapamilu (200  $\mu$ M) podwyższeniu ekspresji GRP78/BiP i CHOP w komórkach linii COLO 205 (Ryc. 38). Glukoza (4 g/l) hamowała także w sposób statystycznie istotny wzmożoną przez werapamil (200  $\mu$ M) ekspresję białka GRP78/BiP w komórkach linii PC-3 (Ryc. 39), efekt ten nie był jednak widoczny w przypadku białka CHOP, którego ekspresja w komórkach PC-3 była podwyższona pod wpływem werapamilu (200  $\mu$ M) niezależnie od stężenia glukozy w pożywce (Ryc. 39). W podsumowaniu przytoczonych wyników można stwierdzić, że werapamil wykazuje silne działanie pobudzające ekspresję markerów stresu siateczki śródplazmatycznej (GRP78/BiP) i apoptozy (CHOP) w komórkach badanych linii komórkowych. Z uwagi na hamujący wpływ glukozy w wyższym z zastosowanych stężeń (4 g/l) na zależną od werapamilu ekspresję wymienionych białek GRP78/BiP i CHOP zasadne wydaje się przypuszczenie, że werapamil indukował stres siateczki z następczym przekierowaniem komórek na tor apoptozy.

Podjęcie o aktywację programowanej śmierci komórki pod wpływem werapamilu potwierdzają wyniki analizy Western blot ukierunkowanej na białka markerowe dla zależnej od aktywacji kaspaz apoptozy w komórkach COLO 205. Werapamil w stopniu zależnym od stężenia (100, 200  $\mu$ M) ale przede wszystkim w stężeniu 200  $\mu$ M aktywował kaspazę 3 i eliminował aktywną PARP (Ryc. 40). Po dodaniu inhibitora autofagii chlorochiny poziom ekspresji wymienionych markerów apoptozy wzrósł w stopniu statystycznie istotnym (Ryc. 40). Ponadto analiza FACS potwierdziła zdolność werapamilu do indukowania programowanej śmierci komórki (podwyższenie frakcji subG<sub>1</sub> komórek COLO 205 na histogramie), która nasilała się pod wpływem jednoczesnego zastosowania werapamilu i chlorochiny (Ryc. 41). Dodatkowo komórki COLO 205 inkubowane z werapamilem (100  $\mu$ M) i chlorochiną były wrażliwe na działanie inhibitora kaspaz – Z-VAD, co świadczy o indukcji apoptozy w tych komórkach (Ryc. 41).

Analiza przeżywalności i zdolności do syntetyzowania DNA (mitogeneza), obraz ultrastruktury komórek, analiza FACS, analiza ekspresji MAP LC3-II i dokumentacja immunoblotingu sugerują również, że werapamil indukował stres siateczki w następstwie ograniczenia komórkom dostępu do glukozy prawdopodobnie na drodze kompetycji o transporter glukozy inny niż SGLT1, SGLT2 i GLUT2 lub modulując wewnątrzkomórkowy metabolizm glukozy. Potwierdzeniem tej sugestii jest fakt, że wiele

z cytotoksycznych skutków działania werapamilu miało charakter odwracalny i zanikało pod wpływem podwyższonego stężenia glukozy w pożywce.

Odnosząc się do danych literaturowych należy wspomnieć, że Meister i wsp. (2010) opisali stres ER pod wpływem działania werapamilu (70  $\mu$ M, 16 h) oraz inhibitora proteasomu – bortezomibu w komórkach szpiczaka mnogiego linii JK-6L. Stres siateczki prowadził w tym przypadku do nagromadzenia reaktywnych form tlenu oraz indukcji procesu przypominającego autofagię (*autophagy-like process*) objawiającego się intensywnym formowaniem autofagosomów. Ponadto w obrazie ultrastrukturalnym badanych komórek widoczna była siateczka śródplazmatyczna o poszerzonych kanałach, co według autorów może potwierdzać indukcję stresu ER z towarzyszącą reakcją UPR. Dodatkowo w wynikach immunoblotingu widoczna była także zwiększona ekspresja białka CHOP. Stres siateczki śródplazmatycznej był także obserwowany po zastosowaniu werapamilu oraz substancji aktywnej z indyjskiego drzewa garcinii (*gambogic acid*), których wspólne działanie podwyższało ekspresję CHOP oraz obniżało ekspresję GRP78/BiP. Z kolei Park i wsp. (2014) podkreślają rolę werapamilu w redukcji stresu siateczki śródplazmatycznej i indukcji autofagii w komórkach wątroby myszy otyłych.

W komórkach COLO 205 oraz PC-3 zmiany patologiczne w obrębie siateczki śródplazmatycznej widoczne w morfologii komórek traktowanych werapamilem mogą świadczyć o indukcji stresu ER, co nie było widoczne w komórkach PNT-2 pod wpływem werapamilu (Ryc. 16-18). Ponadto w badanych komórkach pod wpływem werapamilu zaobserwowano zwiększenie ekspresji GRP78/BiP i CHOP. Aby potwierdzić rolę werapamilu w indukcji stresu siateczki należałoby zastosować inhibitor stresu ER i wykazać obniżenie ekspresji białka GRP78/BiP. Fenylomaślan sodu (4 PBA) znany jest jako „chemiczny czaperon”, ułatwiający naprawę źle uformowanych białek w świetle siateczki, a jego zastosowanie hamuje stres siateczki (Ishimura i wsp., 2014). W przypadku komórek COLO 205 i PC-3 jednoczesne zastosowanie werapamilu oraz 4 PBA (0,5 – 10 mM) okazało się cytotoksyczne (dane nieprzedstawione). Wskazane byłoby zatem wykorzystanie w badaniach innego inhibitora stresu siateczki (np. salubrinalu). W celu ustalenia roli klasteryny w indukowanej werapamilem autofagii należałoby natomiast sprawdzić czy białko to kolokalizuje z białkiem MAP LC3-II w błonie autofagosomów, tak jak to miało miejsce podczas autofagii w komórkach raka stercza (Zhang i wsp., 2014).

Chlorochina oraz jej pochodna – hydroksychlorochina są pierwszymi inhibitorami autofagii zarejestrowanymi i stosowanymi w terapiach przeciwnowotworowych

(Sui i wsp., 2013). W wielu próbach leczenia nowotworów chlorochina jest stosowana w połączeniu z klasyczną chemioterapią z wykorzystaniem cis-platyny czy bortezomibu a także z radioterapią czy immunoterapią (Sui i wsp., 2013, Ozpolat i Benbrook 2015). Rosenfeldt i wsp. (2013) wykazali w badaniach na humanizowanym mysim modelu raka trzustki (PDAC), że rola autofagii zależy od mutacji w genie p53. U myszy posiadających onkogeną wersję białka k-Ras, delecja *Atg5* lub *Atg7* zahamowała rozwój nowotworu. Jednak gdy badane myszy oprócz mutacji w genie *K-Ras* dodatkowo pozbawiono na drodze transgenezy funkcjonalnego białka p53, delecja genów autofagii, a także chemiczne blokowanie autofagii przez zastosowanie hydroksychlorochiny, przyspieszyło rozwój nowotworu (Rosenfeldt i wsp., 2013).

W przedstawionych w pracy badaniach wykazano, iż wysokie stężenie werapamilu (200  $\mu\text{M}$ ) wywoływało cytotoksyczne skutki w komórkach COLO 205 i PC-3. Jednoczesne zastosowanie werapamilu oraz chlorochiny w komórkach COLO 205 pozwoliło na zmniejszenie dawki werapamilu (100  $\mu\text{M}$  zamiast 200  $\mu\text{M}$ ) w celu indukcji programowanej śmierci komórki. Przeprowadzone doświadczenia pozwalają określić miejsce i rolę autofagii w programowanej śmierci komórek indukowanej werapamilem. Wzmocniona autofagia w komórkach COLO 205 wywołana przez werapamil pełniła w ograniczonym stopniu funkcję ochronną przed programowaną śmiercią komórki, a jej zahamowanie przez chlorochinę przyspieszyło śmierć komórek.

Istnieją liczne doniesienia na temat molekularnych mechanizmów indukcji autofagii oraz roli autofagii w modulowaniu programowanej śmierci komórki. Wiadomo, że autofagia nasila się m.in. w konsekwencji zaburzeń gospodarki jonowej oraz zaburzeń metabolizmu, co może prowadzić do upośledzenia mechanizmów odpowiedzi na stres siateczki. Błonowe kanały wapniowe oraz transportery glukozy mogą pełnić ważną rolę w utrzymaniu stałości środowiska wewnętrznego komórki, w tym siateczki śródplazmatycznej m.in. poprzez regulację aktywności białek ER: kalneksyny, kalretikuliny, kalsekwestryny a także kontrolę N-glikozylacji białek (Ogier-Denis i wsp., 2000). Modulatory kanałów wapniowych i dostępności glukozy mogą znaleźć zastosowanie jako potencjalne czynniki usprawniające eliminację komórek nowotworowych. Wykazano, iż 2-DG, syntetyczny analog glukozy indukujący autofagię poprzez blokowanie glikolizy, stosowany wraz z antymycyną A lub metforminą, indukował programowaną śmierć komórki w wielu typach nowotworów. Ponadto terapeutyczne zastosowanie 2-DG w połączeniu ze standardowymi schematami leczenia

(docetaksel, radioterapia), jest aktualnie testowane klinicznie w kierunku leczenia glejaka, raka płuc oraz piersi (Zhang i wsp., 2014). Trwają także badania nad terapeutycznym wykorzystaniem aktywacji autofagii m.in. za pośrednictwem indukcji stresu siateczki (sorafenib), czy aktywacji kinazy AMPK (atorwastatyna) (Sui i wsp., 2013). Modulowanie autofagii wydaje się być skutecznym narzędziem eliminacji komórek nowotworowych, choć rola indukcji autofagii w przeżyciu komórek nowotworowych jest złożona i, zależnie od typu nowotworu oraz stadium jego rozwoju, może prowadzić zarówno do zmniejszenia jak i zwiększenia wrażliwości na chemioterapeutyki i indukcji programowanej śmierci komórki. W mysim modelu niedrobnokomórkowego raka płuca (*non-small cell lung cancer*) zaobserwowano, że delecja genu *Atg7*, koniecznego do inicjacji autofagii, nie miała wpływu na rozwój nowotworu spowodowanego aktywacją onkogenu *K-Ras* i delecją genu *TP53*. W guzach w zaawansowanym stadium rozwoju delecja *Atg7* zahamowała dalszy wzrost nowotworów i prowadziła do programowanej śmierci komórek nowotworowych zanim doszło do zniszczenia zdrowej tkanki (Karsli-Uzunbas i wsp., 2014).

Upośledzenie procesu autofagii może być także korzystne podczas stosowania radioterapii. Delecja *Atg5*, uwrażliwiła na przykład komórki mysich i ludzkich linii nowotworowych (niedrobnokomórkowy rak płuca, rak jelita grubego) na indukcję programowanej śmierci komórki i ograniczyła wzrost nowotworów *in vivo* u myszy z ciężkim złożonym zespołem niedoboru odporności (SCID) pod wpływem radioterapii (Ko i wsp., 2014). Efekt ten nie był jednak obserwowany u immunokompetentnych myszy, gdzie delecja *Atg5* obniżyła skuteczność radioterapii, co świadczy o zależnej od sprawności układu immunologicznego roli autofagii w indukowaniu programowanej śmierci komórki (Ko i wsp., 2014). Powyższe przykłady jak i wyniki badań przedstawione w tej rozprawie mogą być przydatne w dalszym przewidywaniu scenariuszy leczenia przeciwnowotworowego. Autofagia wydaje się być kluczowym elementem odpowiedzi komórek nowotworowych na działanie chemioterapeutyków, dlatego istotne jest poznanie molekularnych mechanizmów prowadzących do jej aktywacji a także ustalenie roli autofagii w indukcji programowanej śmierci komórki. Blokowanie kanałów wapniowych jak i ograniczanie dokomórkowego transportu glukozy czy indukcja stresu siateczki śródplazmatycznej mogą być skutecznymi strategiami służącymi do eliminacji komórek nowotworowych, pod warunkiem wszakże, że nie uszkadza się przy tym komórek prawidłowych. Wykorzystanie w terapiach przeciwnowotworowych znanych

## DYSKUSJA

i stosowanych w leczeniu innych chorób leków może być ważne z punktu widzenia ekonomicznego (chlorochina i hydroksychlorochina są zarejestrowanymi lekami stosowanymi w leczeniu malarii). Równie istotne wydaje się być poszukiwanie homologów werapamilu, które pozwoliłyby uzyskać ten sam skutek np. w niższej dawce terapeutycznej i pozwoliłyby wykorzystać modulowanie procesu autofagii w badaniach translacyjnych.

**8. Wnioski**

1. Ludzkie komórki gruczolakoraka okrężnicy COLO 205 i raka stercza PC-3 są wrażliwsze od normalnych komórek nabłonkowych stercza linii PNT-2 na indukcję autofagii wywołaną przez werapamil.
2. Autofagii indukowanej przez werapamil towarzyszyło zmniejszenie cytozolowego poziomu jonów  $Ca^{2+}$  w komórkach linii COLO 205 i PC-3, ale nie linii PNT-2 i mogło mieć związek z hamowaniem przez werapamil aktywności napięciowo-niezależnych kanałów wapniowych.
3. Wywołana werapamilem autofagia jest następstwem zmniejszenia dostępu glukozy dla komórek i prawdopodobnie wynika z upośledzania dokomórkowego transportu glukozy na drodze hamowania aktywności transporterów glukozy innych niż GLUT2, SGLT1 czy SGLT2.
4. Werapamil powoduje stres siateczki śródplazmatycznej na drodze zależnej od blokowania dostępu glukozy.
5. Molekularny mechanizm indukowanej werapamilem autofagii obejmuje ścieżki sygnałowe angażujące MAP LC3-II, GRP78/BiP i CHOP.
6. Indukowana werapamilem autofagia pełni funkcję ochronną w komórkach COLO 205, przy czym jej późniejsze zahamowanie z użyciem inhibitorów metabolicznych wywołuje w komórkach apoptozę.

## 9. Perspektywy

Wyniki uzyskane z badań *in vitro* nad wpływem werapamilu na ludzkie komórki nowotworowe gruczolaka okrężnicy linii COLO 205 i raka stercza PC-3 oraz normalne komórki nabłonkowe stercza linii PNT-2 wskazują na zasadniczą rolę jaką autofagia pełni w przeżyciu komórek nowotworowych. Do nowych nieswoistych właściwości werapamilu można zaliczyć jego zdolność do indukowania autofagii, ważniejsza jest jednak obserwacja, że po zahamowaniu wywołanej przez werapamil autofagii komórki nowotworowe w sposób bardziej efektywny przekierowywane są na tor apoptozy. Nasuwa się przypuszczenie, że w komórkach nowotworowych dobrze rozwinięte mechanizmy antyapoptozy można ominąć zmuszając komórki najpierw do uruchomienia procesu autofagii, która ma je uratować np. przed skutkami stresu siateczki śródplazmatycznej, po czym późniejsze jej (autofagii) zahamowanie prowadzi do torowania alternatywnej ścieżki apoptozy zależnej od autofagii. Konieczne są dalsze badania zmierzające do wyjaśnienia, czy strategię wywoływania autofagii z następczym jej zahamowaniem skutkującym apoptozą uda się w przyszłości wykorzystać w onkologii.



**10. Spis rycin**

<b>Ryc.1</b>	Schematyczne przedstawienie poszczególnych etapów autofagii, zilustrowane zdjęciami wykonanymi w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM)	19
<b>Ryc.2</b>	Molekularny mechanizm formowania struktury autofagosomu podczas autofagii.....	20
<b>Ryc.3</b>	Schematyczne przedstawienie relacji pomiędzy autofagią a apoptozą.....	23
<b>Ryc.4</b>	Dystrybucja kanałów wapniowych w komórce.....	26
<b>Ryc.5</b>	Autofagia aktywowana za pośrednictwem stresu ER i towarzyszącej mu reakcji UPR. ....	34
<b>Ryc.6</b>	Struktura chemiczna werapamilu.....	39
<b>Ryc.7</b>	Wpływ wzrastających stężeń inhibitora kanałów wapniowych typu L - werapamilu (50, 100, 200 $\mu$ M) na przeżywalność (test MTT) oraz proliferację (test z fioletem krystalicznym) komórek linii COLO 205. ....	58
<b>Ryc.8</b>	Wpływ wzrastających stężeń inhibitora kanałów wapniowych typu L - werapamilu (50, 100, 200 $\mu$ M) na przeżywalność (test MTT) oraz proliferację (test z fioletem krystalicznym) komórek linii PC-3.....	59
<b>Ryc.9</b>	Wpływ wzrastających stężeń inhibitora kanałów wapniowych typu L - werapamilu (50, 100, 200 $\mu$ M) na przeżywalność (test MTT) oraz proliferację (test z fioletem krystalicznym) komórek linii PNT-2. ....	60
<b>Ryc.10</b>	Wpływ werapamilu na ultrastrukturę komórek COLO 205.....	62
<b>Ryc.11</b>	Wpływ werapamilu na ultrastrukturę komórek PC-3.....	63
<b>Ryc.12</b>	Wpływ werapamilu na ultrastrukturę komórek PNT-2.....	64
<b>Ryc.13</b>	Różne etapy formowania wakuol autofagowych w komórkach COLO 205 traktowanych werapamilem. ....	65
<b>Ryc. 14</b>	Różne etapy formowania wakuol autofagowych w komórkach PC-3 traktowanych werapamilem. ....	66
<b>Ryc.15</b>	Różne etapy formowania wakuol autofagowych w komórkach PNT-2 traktowanych werapamilem. ....	67

<b>Ryc.16</b>	Wpływ werapamilu na ultrastrukturę siateczki śródplazmatycznej w komórkach COLO 205. ....	68
<b>Ryc.17</b>	Wpływ werapamilu na ultrastrukturę siateczki śródplazmatycznej w komórkach PC-3. ....	69
<b>Ryc.18</b>	Wpływ werapamilu na ultrastrukturę siateczki śródplazmatycznej w komórkach PNT-2. ....	70
<b>Ryc.19</b>	Wpływ inhibitora kanałów wapniowych typu L – werapamilu (100 $\mu$ M, 6 godz.) na lokalizację białka MAP LC3-II w błonie autofagosomów. ....	71
<b>Ryc.20</b>	Wpływ wzrastających stężeń inhibitora kanałów wapniowych typu L - werapamilu (Wer, 50, 100, 200 $\mu$ M) w obecności lub bez inhibitorów proteaz lizosomalnych – E64d i pepstatyny A (E/PA, 10 $\mu$ M) na ekspresję białka MAP LC3-II w komórkach linii COLO 205 i PC-3. ....	72
<b>Ryc.21</b>	Wpływ wzrastających stężeń inhibitora kanałów wapniowych typu L - werapamilu (Wer, 50, 100, 200 $\mu$ M) w obecności lub bez inhibitorów proteaz lizosomalnych – E64d i pepstatyny A (E/PA, 10 $\mu$ M) na ekspresję białka MAP LC3-II w komórkach linii PNT-2. ....	73
<b>Ryc.22</b>	Wpływ wzrastających stężeń inhibitora kanałów wapniowych typu L - werapamilu (Wer, 100, 200 $\mu$ M) na ekspresję białek Bekliny 1 i Vps34 w komórkach linii COLO 205. ....	74
<b>Ryc.23</b>	Wpływ wzrastających stężeń inhibitora kanałów wapniowych typu L - werapamilu (Wer, 100, 200 $\mu$ M) na ekspresję białek Bekliny 1 i Vps34 w komórkach linii PC-3. ....	74
<b>Ryc.24</b>	Wpływ wzrastających stężeń inhibitora kanałów wapniowych typu L - werapamilu (Wer, 100, 200 $\mu$ M) na ekspresję białka Bcl-2 w komórkach linii COLO 205 i PC-3. ....	75
<b>Ryc.25</b>	Wpływ inhibitora kanałów wapniowych typu L - nifedypiny (Nif, 50, 100, 200 $\mu$ M) na przeżywalność komórek wymienionych linii komórkowych (test MTT). ....	77
<b>Ryc.26</b>	Wpływ inhibitora kanałów wapniowych typu L – nifedypiny (Nif, 50, 100, 200 $\mu$ M) na proliferację komórek wymienionych linii komórkowych (test z fioletem	

	krystalicznym).....	78
<b>Ryc.27</b>	Wpływ inhibitora kanałów wapniowych typu L - nifedypiny (Nif, 100, 200 $\mu\text{M}$ ) oraz nifedypiny w obecności werapamilu (Wer, 100, 200 $\mu\text{M}$ ) na przeżywalność komórek linii komórkowej COLO 205 (test MTT).....	79
<b>Ryc.28</b>	Wpływ inhibitora kanałów wapniowych typu L - nifedypiny (Nif, 100, 200 $\mu\text{M}$ ) na skutki wzrastających stężeń werapamilu (Wer, 100, 200 $\mu\text{M}$ ) dla przeżywalności komórek linii komórkowej PC-3 (test MTT). ....	80
<b>Ryc.29</b>	Wpływ inhibitorów kanałów wapniowych typu L – werapamilu i nifedypiny (Wer, Nif, 100 $\mu\text{M}$ ) na stężenie zjonizowanego wapnia w cytoplazmie $[\text{Ca}^{2+}]_c$ komórek badanych linii komórkowych (test FURA-2) po 24 godz. inkubacji..	81
<b>Ryc.30</b>	Zapis prądów w roztworze zewnątrzkomórkowym z $\text{CaCl}_2$ (2 mM) w komórkach linii COLO 205 i PC-3. ....	83
<b>Ryc.31</b>	Wpływ lantanu ( $\text{LaCl}_3$ , 100 $\mu\text{M}$ ) na prądy napięciowo-niezależne na przykładzie komórki PC3.....	84
<b>Ryc.32</b>	Charakterystyka natężenia od napięcia prądu (I/V) dla przykładowych rejestracji prądów w komórkach COLO 205 oraz PC-3 w obecności 2 mM $\text{Ca}^{2+}$ oraz w roztworze zewnątrzkomórkowym wolnym od jonów wapnia. ....	85
<b>Ryc.33</b>	Wartości potencjałów odwrócenia prądów rejestrowanych w komórkach COLO 205 oraz PC-3.....	86
<b>Ryc.34</b>	Wpływ werapamilu (Wer, 200 $\mu\text{M}$ , 1 godz.) na wartości potencjału odwrócenia prądu w komórkach COLO 205 i PC-3.....	87
<b>Ryc.35</b>	Wpływ glukozy (Glu, 2 g/l) oraz glukozy w obecności werapamilu (Wer, 100, 200 $\mu\text{M}$ ) na przeżywalność linii komórkowych COLO 205 i PC-3 (test MTT).	88
<b>Ryc.36</b>	Wpływ inhibitora dokomórkowego transportu glukozy – floretyny (Fl, 100, 200 $\mu\text{M}$ ) oraz floretyny w obecności werapamilu (Wer, 200 $\mu\text{M}$ ) na przeżywalność komórek COLO 205 i PC-3 (test MTT).....	89
<b>Ryc.37</b>	Wpływ wzrastających stężeń inhibitora kanałów wapniowych typu L - werapamilu (Wer, 100, 200 $\mu\text{M}$ ) na ekspresję białka GLUT1 w komórkach linii COLO 205 i PC-3.....	90
<b>Ryc.38</b>	Wpływ wzrastających stężeń inhibitora kanałów wapniowych typu L -	

- werapamilu (Wer, 100, 200  $\mu$ M) w obecności niskiego (1 g/l) lub wysokiego (4 g/l) stężenia glukozy w pożywce, na ekspresję białek CHOP i GRP78/BIP w komórkach linii COLO 205.....91
- Ryc.39** Wpływ wzrastających stężeń inhibitora kanałów wapniowych typu L - werapamilu (Wer, 100, 200  $\mu$ M) w obecności niskiego (1 g/l) lub wysokiego (4 g/l) stężenia glukozy w pożywce, na ekspresję białek CHOP i GRP78/BIP w komórkach linii PC-3. ....92
- Ryc.40** Wpływ inhibitora autofagii – chlorochiny (Chlq 10  $\mu$ M) w obecności wzrastających stężeń inhibitora kanałów wapniowych typu L - werapamilu (Wer, 100, 200  $\mu$ M), na ekspresję białka PARP oraz kaspazy 3 w komórkach linii COLO 205, po 24 godz. inkubacji. ....95
- Ryc.41** Wpływ wzrastających stężeń inhibitora kanałów wapniowych typu L - werapamilu (Wer, 100, 200  $\mu$ M) w obecności inhibitora autofagii – chlorochiny (Chlq 10  $\mu$ M) oraz inhibitora aktywacji kaspaz – Z-VAD (50  $\mu$ M), na indukcję programowanej śmierci komórki w komórkach linii COLO 205, po 24 godz. inkubacji. ....96

**11. Piśmiennictwo**

1. Abais JM., Xia M., Li G., Chen Y., Conley SM., Gehr TW., Boini KM., Li PL. Nod-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome activation and podocyte injury via thioredoxin-interacting protein (TXNIP) during hyperhomocysteinemia. *J Biol Chem.* (2014) 289: 27159-68;
2. Abdelmohsen K., Srikantan S., Tominaga K., Kang M-J., Yaniv Y., Martindale J.L., Yang X., Park S-S., Becker K.G., Subramanian M., Maudsley S., Lal A., Gorospe M. Growth Inhibition by miR-519 via Multiple p21-Inducing Pathways. *Mol Cell Biol* (2012) 32: 2530–2548;
3. Agostinis P. and Samali A. *Endoplasmic Reticulum Stress in Health and Disease.* Springer (2012); ISBN 978-94-007-4351-9 (eBook);
4. Ahn JH., Ahn SK., Lee M. The role of autophagy in cytotoxicity induced by new oncogenic B-Raf inhibitor U1-152 in v-Ha-ras transformed fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* (2012) 417: 857-863;
5. Al Dhaheri Y., Attoub S., Ramadan G., Arafat K., Bajbouj K., Karuvantevida N., AbuQamar S., Eid A., Iratni R. Carnosol Induces ROS-Mediated Beclin1-Independent Autophagy and Apoptosis in Triple Negative Breast Cancer. *Plos One* (2014) 9: e109630;
6. American Type Culture Collection, <https://www.lgcstandards-atcc.org>;
7. Ardizzone T., Lu X-H., Dwyer D. Calcium-independent inhibition of glucose transport in PC-12 and L6 cells by calcium channel antagonists. *Am J Physiol Cell Physiol* (2002) 283: C579-C586;
8. Avivar-Valderas A., Salas E., Bobrovnikova-Marjon E., Diehl JA., Nagi C., Debnath J., Aguirre-Ghiso JA. PERK integrates autophagy and oxidative stress responses to promote survival during extracellular matrix detachment. *Mol Cell Biol* (2011) 31: 3616-3629;

9. Balantinou E., Trougakos JP., Chondrogianni N., Margaritis LH., Gonos ES. Transcriptional and posttranslational regulation of clusterin by the two main cellular proteolytic pathways. *Free Radic Biol Med* (2009) 46: 1267–1274;
10. Bao X-x., Xie B-s., Li Q., Li X-p., Wei L-h. Wang J-l. Nifedipine induced autophagy through Beclin1 and mTOR pathway in endometrial carcinoma cells. *Chin Med J* (2012) 125(17): 3120-3126;
11. Bennett H.L., Fleming J.T., O'Prey J., Ryan K.M., Leung H.Y. Androgens modulate autophagy and cell death via regulation of the endoplasmic reticulum chaperone glucose-regulated protein 78/BiP in prostate cancer cells. *Cell Death Dis* (2010) 1: e72, doi:10.1038/cddis.2010.50;
12. Bhattacharya J., Chakrabarti MK. Rise of intracellular free calcium levels with activation of inositol triphosphate in a human colonic carcinoma cell line (COLO 205) by heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *BBA* (1998) 1403: 1–4;
13. Blessing A., Xu L., Gao G., Bollu LR., Ren J., Li H., Wu X., Su F., Huang WC., Hung MC., Huo L., Palapattu GS., Weihua Z. Sodium/Glucose Co-transporter 1 Expression Increases in Human Diseased Prostate. *J Cancer Sci Ther* (2012) 4.9, doi.org/10.4172/1948-5956.1000159;
14. Boyce M., Yuan J. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Differ* (2006) 13: 363-373;
15. Boone AN., Senatore A., Chemin J., Monteil A2., Spafford JD. Gd<sup>3+</sup> and calcium sensitive, sodium leak currents are features of weak membrane-glass seals in patch clamp recordings. *Plos One* (2014) 9: e98808, doi: 10.1371/journal.pone.0098808;
16. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*(1976) 72: 248-254;
17. Cao QZ., Niu G., Tan HR. In vitro growth inhibition of human colonic tumor cells by Verapamil. *World J Gastroenterol* (2005) 11: 2255-2259;

18. Chen R., Zeng X., Zhang R., Huang J., Kuang X., Yang J., Liu J., Tawfik O., Thrasher J.B., Li B. Cav1.3 channel  $\alpha 1D$  protein is overexpressed and modulates androgen receptor transactivation in prostate cancers. *Urol Oncol* (2014) 32: 524-536;
19. Cheng X, Liu H, Jiang CC, Fang L, Chen C, Zhang XD, Jiang ZW. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy through IRE1/JNK/beclin-1 in breast cancer cells. *Int J Mol Med* (2014) 34: 772-781;
20. Christofk HR., Vander Heiden MG., Harris MH., Ramanathan A., Gerszten RE., Wei R., Fleming MD., Schreiber SL., Cantley LC. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* (2008) 452: 230-3;
21. Chung MK., Guler AD., Caterina MJ. Biphasic Currents Evoked by Chemical or Thermal Activation of the Heat-gated Ion Channel, TRPV3. *J Biol Chem* (2005) 280: 15928–15941;
22. Colton CK., Zhu MX. 2-Aminoethoxydiphenyl borate as a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3 channels. *Handb Exp Pharmacol* (2007) 179: 173-87;
23. Crighton D., Wilkinson S., O'Prey J., Syed N., Smith P., Harrison P., Gasco M., Garrone O., Crook T., Ryan KM. DRAM, a p53-Induced Modulator of Autophagy, Is Critical for Apoptosis. *Cell* (2006) 126: 121–134;
24. Dando I., Donadelli M., Costanzo C., Dalla Pozza E., D'Alessandro A., Zolla L., Palmieri M. Cannabinoids inhibit energetic metabolism and induce AMPK-dependent autophagy in pancreatic cancer cells. *Cell Death Dis* (2013) 4: e664: doi:10.1038/cddis.2013.151;
25. Decuypere J-P., Kindt D., Luyten T., Welkenhuyzen K., Missiaen L., De Smedt H., Bultynck G., Parys J.B. mTOR-Controlled Autophagy Requires Intracellular Ca<sup>2+</sup> Signaling. *Plos One* (2013) 8: 4, e61020;
26. Díaz-Lezama N., Hernández-Elvira M., Sandoval A., Monroy A., Felix R., Monjaraz E. Ghrelin inhibits proliferation and increases T-type Ca<sup>2+</sup> channel

- expression in PC-3 human prostate carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* (2010) 403: 24-9;
27. DiPaola R., Dvorzhinski D., Thalasila A., Garikapaty V., Doram D., May M., Matthew R., Beaudoin B., Karp C., Stein M., Foran D., White E. Therapeutic Starvation and Autophagy in Prostate Cancer: A New Paradigm for Targeting Metabolism in Cancer Therapy. *Prostate* (2008) 68: 1743-1752;
  28. Eisenberg-Lerner A., Bialik S., Simon HU., Kimchi A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ* (2009) 16: 966-75;
  29. Firlej V., Mathieu JR., Gilbert C., Lemonnier L., Nakhlé J., Gallou-Kabani C., Guarmit B., Morin A., Prevarskaya N., Delongchamps NB., Cabon F. Thrombospondin-1 triggers cell migration and development of advanced prostate tumors. *Cancer Res* (2011) 71: 7649-58;
  30. Galluzzi L., Morselli E., Kepp O., Maiuri MC., Kroemer G. Defective autophagy control by the p53 rheostat in cancer. *Cell Cycle* (2010) 9: 250-255;
  31. Gozuacik D., Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* (2004) 23: 2891-2906;
  32. Green DR., Galluzzi L., Kroemer G. Metabolic control of cell death. *Science* (2014) 345: 1250256;
  33. Guo GF, Cai YC, Zhang B, Xu RH, Qiu HJ, Xia LP, Jiang WQ, Hu PL, Chen XX, Zhou FF, Wang F. Overexpression of SGLT1 and EGFR in colorectal cancer showing a correlation with the prognosis. *Med Oncol* (2011) 28: 197-203;
  34. Guo JY., Xia B., White E. Autophagy-Mediated Tumor Promotion. *Cell* (2013) 155: 1216–1219;
  35. Ha T-K., Her N-G., Lee M-G. et al. Caveolin-1 Increases Aerobic Glycolysis in Colorectal Cancers by Stimulating HMGA1-Mediated GLUT3 Transcription. *Cancer Res* (2012) 72: 4097-4109;



36. Han F., Gu D., Chen Q., Zhu H. Caveolin-1 acts as a tumor suppressor by down-regulating epidermal growth factor receptor-mitogen-activated protein kinase signaling pathway in pancreatic carcinoma cell lines. *Pancreas* (2009) 38: 766-74;
37. Hoyer-Hansen M., Bastholm L., Szyniarowski P., Campanella M., Szabadkai G., Farkas T., Bianchi K., Fehrenbacher N., Elling F., Rizzuto R. Control of Macroautophagy by Calcium Calmodulin-Dependent Kinase Kinase- $\beta$ , and Bcl-2. *Molec Cell* (2007) 25: 193-205;
38. Hoyer-Hansen M., Jaattela M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium; *Cell Death Differ* (2007) 14: 1576-1582;
39. Huang SM. Cheung CW., Chang CS., Tang CH., Liu JF., Lin YH., Chen JH., Ko SH., Wong KR., Lu DY. Phloroglucinol Derivative MCPPP Induces Cell Apoptosis in Human Colon Cancer. *J Cell Biochem* (2011) 112: 643–652;
40. Ikenoue T., Hong S., Inoki K. Monitoring Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Activity. *Methods Enzymol* (2009) 452, doi: 10.1016/S0076-6879(08)03611-2;
41. Kang SW., Yoon SY., Park JY., Kim DH. Unglycosylated clusterin variant accumulates in the endoplasmic reticulum and induces cytotoxicity. *Int J Biochem Cell Biol* (2013) 45: 221-231;
42. Kaighn ME., Narayan KS., Ohnuki Y., Lechner JF., Jones LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* (1979) 17: 16-23;
43. Kania E., Pająk B., Orzechowski A. Calcium Homeostasis and ER Stress in Control of Autophagy in Cancer Cells. *Biomed Res Int* (2015) article ID 352794, doi: 10.1155/2015/352794;
44. Karsli-Uzunbas G., Guo JY., Price S., Teng X., Laddha SV., Khor S., Kalaany NY., Jacks T., Chan CS., Rabinowitz JD., White E. Autophagy is required for glucose homeostasis and lung tumor maintenance. *Cancer Discov* (2014) 4: 914-927;

45. Kitzman HH. Jr., McMahon RJ., Aslanian AM., Fadia PM., Frost SC. Differential Regulation of GRP78 and GLUT1 expression in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biochem* (1996) 162: 51-58;
46. Klionsky D., Abdalla FC., Abeliovich H., Abraham RT. i wsp. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* (2012) 8: 445–544;
47. Ko A., Kanehisa A., Martins I., Senovilla L., Chargari C., Dugue D., Marino G., Kepp O., Michaud M., Perfettini J-L., Kroemer G., Deutsch E. Autophagy inhibition radiosensitizes in vitro, yet reduces radioresponses in vivo due to deficient immunogenic signaling. *Cell Death Differ* (2014) 21: 92–99;
48. Kondratskyi A., Yassine M., Kondratska K., Skryma R., Slomianny Ch., Prevarskaya N. Calcium-permeable ion channels in control of autophagy and cancer. *Front Physiol* (2013) 4, doi: 10.3389/fphys.2013.00272;
49. Krzeslak A., Wojcik-Krowiranda K., Forma E., Jozwiak P., Romanowicz H., Bienkiewicz A., Brys M. Expression of GLUT 1 and GLUT 3 Glucose Transporters in Endometrial and Breast Cancers. *Pathol Oncol Res* (2012) 18: 721-728;
50. Lai KC., Kuo CL., Ho HC., Yang JS., Ma CY., Lu HF., Huang HY., Chueh FS., Yu CC., Chung JG. Diallyl sulfide, diallyl disulfide and diallyl trisulfide affect drug resistant gene expression in colo 205 human colon cancer cells in vitro and in vivo. *Phytomedicine* (2012) 19: 625-30;
51. Lai ZR., Chou CT., Liu SI., Liang WZ., Huang JK., Jan CR. Effect of BayK 8644 on  $[Ca^{2+}]_i$  and viability in PC3 human prostate cancer cells. *Chin J Physiol* (2013) 56: 318-25;
52. Larocque K., Ovadje P., Djurdjevic S., Mehdi M., Green J., Pandey S. Novel Analogue of Colchicine Induces Selective Pro- Death Autophagy and Necrosis in Human Cancer Cells. *Plos One* (2014) 9: e87064;
53. Li J., Ni M., Lee B, Barron E., Hinton DR., Lee AS. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and

- stress-induced autophagy in mammalian cells. *Cell Death Differ* (2008) 15: 1460-1471;
54. Lim J.A., Li L, Kakhlon O., Myerowitz R., Raben N. Defects in calcium homeostasis and mitochondria can be reversed in Pompe disease. *Autophagy* (2015) 11: 385-402;
55. Liu D., Yang Y., Quan L., Wang J. Inhibition of autophagy by 3-MA potentiates cisplatin-induced apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells. *Med Oncol* (2011) 28:105–111;
56. Liu H., Hughes J.D., Rollins S., Chen B., Perkins E. Calcium entry via ORAI1 regulates glioblastoma cell proliferation and apoptosis. *Exp Mol Pathol* (2011) 91: 753–760;
57. Liu Y., Levine B. Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell death differ* (2015) 22: 367-376;
58. Louters LL., Stehouwer N., Rekman J., Tidball A., Cok A., Holstege CP. Verapamil Inhibits the Glucose Transport Activity of GLUT1. *J Med Toxicol* (2010) 6: 100–105;
59. Lozy F., Karantza V. Autophagy and cancer cell metabolism. *Semin Cell Dev Biol* (2012) 23: 395–401;
60. Luo B, Lee AS. The critical role of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies. *Oncogene* (2013) 32: 805-818;
61. MacDonald RS., Thomson EH., Bean TL. Insulin and IGE-1 receptors in a human intestinal adenocarcinoma cell line (CACO-2): regulation of Na<sup>+</sup> glucose transport across the brush border. *J Recept Res* (1993) 13: 1093-1113;
62. Macheda M., Rogers S., Best J. Molecular and Cellular Regulation of Glucose Transporter (GLUT) Proteins in Cancer. *J Cell Physiol* (2005) 202: 654-662;
63. Macintosh R., Ryan K. Autophagy in tumor cell death. *Semin Cancer Biol* (2013) 23: 344–351;

64. MedlinePlus, Service of the U.S. National Library of Medicine, 2015  
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/meds/a684030.html>;
65. Meister S., Frey B., Lang V., Gaipf U., Schett G., Schlotzer-Schrehardt U., Voil R. Calcium Channel Blocker Verapamil Enhances Endoplasmic Reticulum Stress and Cell Death Induced by Proteasome Inhibition in Myeloma Cells. *Neoplasia* (2010) 12: 550-561;
66. Miao Q., Bi LL., Li X., Miao S., Zhang J., Zhang S., Yang Q., Xie YH., Zhang J., Wang S. Anticancer Effects of Bufalin on Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells: Roles of Apoptosis and Autophagy. *Int J Mol Sci* (2013) 14: 1370–1382;
67. Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, Vicencio JM, Criollo A, Maiuri MC, Kroemer G. Anti- and pro-tumor functions of autophagy. *Biochim Biophys Acta* (2009) 1793: 1524-1532;
68. Munns CH., Chung MK., Sanchez YE., Amzel LM., Caterina MJ. Role of the outer pore domain in transient receptor potential vanilloid 1 dynamic permeability to large cations. *J Biol Chem* (2015) 9:5707-24;
69. Nixon R. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med* (2013) 19: 983-997;
70. Orvedahl A., Sumpter R Jr., Xiao G., Ng A., Zou Z., Tang Y., Narimatsu M., Gilpin C., Sun Q., Roth M., Forst CV., Wrana JL., Zhang YE., Luby-Phelps K., Xavier RJ., Xie Y., Levine B. Image-based genome-wide siRNA screen identifies selective autophagy factors. *Nature* (2011) 480:113-7;
71. O’Sullivan J., Whyte L., Drake J., Tenniswood M. Alterations in the post-translational modification and intracellular trafficking of clusterin in MCF-7 cells during apoptosis. *Cell Death Differ* (2003) 10: 914–927;
72. Ogata M., Hino S., Saito A., Morikawa K., Kondo S., Kanemoto S. et al. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* (2006) 26: 9220-9231;

73. Ogier-Denis E., Bauvy C., Cluzeaud F., Vandewalle A., Codogno P. Glucose persistence on high-mannose oligosaccharides selectively inhibits the macroautophagic sequestration of N-linked glycoproteins. *Biochem J* (2000) 345: 459-466;
74. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* (2004) 11: 381-389;
75. Ozpolat B., Benbrook DM. Targeting autophagy in cancer management – strategies and developments. *Cancer Manag Res* (2015) 7: 291-299;
76. Pająk B., Orzechowski A. Regulation of clusterin activity by calcium. *Adv Canc Res* (2009) 104: 33-58;
77. Pająk B., Kania E., Gajkowska B., Orzechowski A. Verapamil-induced autophagy-like process in colon adenocarcinoma COLO 205 cells; the ultrastructural studies. *Pharmacol Rep* (2012) 64: 991-6;
78. Park HW., Park H., Semple IA., Jag I., Ro SH., Kim M., Cazares VA., Stuenkel EL., Kim JJ., Kim JS., Lee JH. Pharmacological correction of obesity-induced autophagy arrest using calcium channel blockers. *Nat Commun* (2014) 5:4834, doi: 10.1038/ncomms5834;
79. Peng X., Li W., Yuan L., Mehta RG., Kopelovich L., McCormick DL. Inhibition of proliferation and induction of autophagy by atorvastatin in PC3 prostate cancer cells correlate with downregulation of Bcl2 and upregulation of miR-182 and p21. *Plos One* (2013) 8: e70442, doi: 10.1371/journal.pone.0070442;
80. Pingsheng F., Tengyue Z., Qiang H., Qiang W., Xin S., Liting Q. Basic and Clinical Research on the Therapeutic Effect of Intervention in Primary Liver Cancer by Targeted Intra-Arterial Verapamil Infusion. *Cell Biochem Biophys* (2012) 62: 59–67;
81. Pinton, P., Giorgi, C., Siviero, R., Zecchini, E., and Rizutto, R. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca<sup>2+</sup> transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* (2008) 27, 6407-6418;

82. Powolny AA., Bommarreddy A., Hahm E-R., Normolle DP., Beumer JH., Nelson JB., Singh SV. Chemopreventative Potential of the Cruciferous Vegetable Constituent Phenethyl Isothiocyanate in a Mouse Model of Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst* (2011) 103: 571–584;
83. PubChem - <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>;
84. Pucci S., Bonanno E., Pichiorri F., Angeloni C., Spagnoli LG. Modulation of different clusterin isoforms in human colon tumorigenesis. *Oncogene* (2004) 23: 2298-304;
85. Qiu W., Su .2, Xie F., Ai J., Ren Y., Zhang J., Guan R., He W., Gong Y., Guo Y. Tetrandrine blocks autophagic flux and induces apoptosis via energetic impairment in cancer cells. *Cell Death Dis* (2014) 5: e1123, doi: 10.1038/cddis.2014.84;
86. Ramirez-Peinado S. León-Annicchiarico CL., Galindo-Moreno J., Iurlaro R., Caro-Maldonado A, Prehn JHM., Ryan KM., Munoz-Pinedo C. Glucose-starved Cells Do Not Engage in Prosurvival Autophagy. *J Biol Chem* (2013) 288:30387-30398;
87. Rim H-K., Cho S., Shin D-H., Chung K-S., Cho Y-W., Choi Y-H., Lee JY., Lee K-T. T-Type Ca<sup>2+</sup> Channel Blocker, KYS05090 Induces Autophagy and Apoptosis in A549 Cells through Inhibiting Glucose Uptake. *Molecules* (2014) 19: 9864-9875;
88. Rosenfeldt MT., O’Prey J., Morton JP., Nixon C., MacKay G., Mrowinska A., Au A., Rai TS., Zheng L., Ridgway R., Adams PD., Anderson KI., Gottlieb E., Sansom OJ., Ryan KM. p53 status determines the role of autophagy in pancreatic tumor development. *Nature* (2013) 504: 296-313;
89. Rouschop KM., van den Beucken T., Dubois L., Niessen H., Bussink J., Savelkoul K., Keulers T., Mujcic H., Landuyt W., Voncken JW., Lambin P., van der Kogel AJ., Koritzinsky M., Wouters BG. The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J Clin Invest* (2010) 120: 127-141;

90. Ryter S., Mizumura K., Choi A. The Impact of Autophagy on Cell Death Modalities. *Int. J Cell Biol* (2014), doi: 10.1155/2014/502676;
91. Salazar M., Carracedo A., Salanueva IJ., Hernández-Tiedra S., Lorente M., Egia A., Vázquez P., Blázquez C., Torres S., García S., Nowak J., Fimia GM., Piacentini M., Cecconi F., Pandolfi PP., González-Feria L., Iovanna JL., Guzmán M., Boya P., Velasco G. Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J Clin Invest* (2009) 119: 1359–1372;
92. Santoni G., Santoni M., Nabissi M. Functional role of T-type calcium channels in tumor growth and progression: prospective in cancer therapy. *Br J Pharmacol* (2012) 166: 1244–1246;
93. Shanmugam M., McBrayer S.K., Qian J., Raikoff K., Avram M.J Singhal S., Gandhi V., Schumacker P.T., Krett N.L., Rosen S.T. Targeting Glucose Consumption and Autophagy in Myeloma with the Novel Nucleoside Analogue 8-Aminoadenosine. *J Biol Chem* (2009) 284: 26816–26830;
94. Shapovalov G., Lehen'kyi V., Skryma R., Prevarskaya N. TRP channels in cell survival and cell death in normal and transformed cells. *Cell Calcium* (2011) 50: 295 – 302;
95. Shchepotin IB., McRae DA., Shabahang M., Buras RR., Evans SR. Hyperthermia and verapamil inhibit the growth of human colon cancer xenografts in vivo through apoptosis. *Anticancer Res* (1997) 17: 2213-6;
96. Shchepotin IB., Soldatenkov V., Wroblewski JT., Surin A., Shabahang M., Buras RR., Nauta RJ., Pulyaeva H., Evans SR. Apoptosis induced by hyperthermia and verapamil in vitro in a human colon cancer cell line. *Int J Hyperthermia* (1997) 13: 547-57;
97. Singh R. Hypothalamic lipophagy and energetic balance. *Aging* (2011) 3: 934-942;

98. Song L., Liu H., Ma L., Zhang X., Jiang Z., Jiang C. Inhibition of autophagy by 3-MA enhances endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Oncol Lett* (2013) 6: 1031-1038;
99. Spengler G., Handzlik J., Ocsovszki I., Viveiros M., Kiec-Kononowicz K., Molnar J., Amaral L. Modulation of multidrug efflux pump activity by new hydantoin derivatives on colon adenocarcinoma cells without inducing apoptosis. *Anticancer Res* (2011) 31: 3285-8;
100. Stewart EM., Aquilina JA., Easterbrook-Smith SB., Murphy-Durland D., Jacobsen C., Moestrup S., Wilson MR. Effects of glycosylation on the structure and function of the extracellular chaperone clusterin. *Biochem* (2007) 46: 1412-1422;
101. Strigun A., Noor F., Pironti A., Niklas J., Yang T., Heinzle E. Metabolic flux analysis gives an insight on verapamil induced changes in central metabolism of HL-1 cells. *J Biotech* (2011) 155: 299-307;
102. Sui X., Chen R., Wang Z., Huang Z., Kong N., Zhang M., Han W., Lou F., Yang J., Zhang Q., Wang X., He C., Pan H. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis* (2013) 4: e838, doi:10.1038/cddis.2013.350;
103. Tcherniuk SO., Oleinikov AV. Pgp efflux pump decreases the cytostatic effect of CENP-E inhibitor GSK923295. *Cancer Lett* (2015) 361: 97-103;
104. Todde V., Veenuis M., van der Klei IJ. Autophagy: Principles and significance in health and disease. *BBA* (2009) 1792: 3-13;
105. Trompier D., Chang X-B., Barattin R., d'Hardemare A., Di Pietro A., Baubichon-Cortay H. Verapamil and its Derivative Trigger Apoptosis through Glutathione Extrusion by Multidrug Resistance Protein MRP 1. *Cancer Res* (2004) 64: 4950-4956;
106. Ugocsai K., Varga A., Molnár P., Antus S., Molnár J. Effects of selected flavonoids and carotenoids on drug accumulation and apoptosis induction in



- multidrug-resistant colon cancer cells expressing MDR1/LRP. *In Vivo* (2005) 19:433-8;
107. Vicencio JM., Ortiz C., Criollo A., Jones AWE., Kepp O., Galluzzi L., Joza N., Vitale I., Morselli E., Tailler M., Castedo M., Maiuri MC., Molgo J., Szabadkai G., Lavandro S., Kroemer G. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates autophagy through its interaction with Beclin 1. *Cell Death Differ* (2009) 16: 1006-1017;
108. Wang S., Yu Q., Zhang R., Liu B. Core signalling pathways of survival/death in autophagy-related cancer networks. *Int J Biochem Cell Biol* (2011) 43:1263-6, doi: 10.1016/j.biocel.2011.05.010;
109. Wang X., Eno C.O., Altman B.J., Zhu Y., Zhao G., Olberding K.E., Rathmell J.C., Li C. ER Stress Modulates Cellular Metabolism. *Biochem J* (2011) 435: 285–296;
110. Wang XT., Nagaba Y., Cross HS., Wrba F., Zhang L., Guggino SE: The mRNA of L-type calcium channel elevated in colon cancer: protein distribution in normal and cancerous colon. *Am J Pathol* (2000) 157, 1549–1562;
111. Wang Y., Wang W., Wang S., Wang J., Shao S., Wang Q. Down-regulation of GRP78 is associated with the sensitivity of chemotherapy to VP-16 in small cell lung cancer NCI-H446 cells. *BMC Cancer* (2008) 8: 372, doi:10.1186/1471-2407-8-372;
112. Wilkinson S., Croft DR., O’Prey J., Meedendorp A., O’Prey M., Dufès C., Ryan KM. The cyclin-dependent kinase PITSLRE/CDK11 is required for successful autophagy. *Autophagy* (2011) 7: 1295-1301;
113. Williams JA., Hou Y., Ni H-M. Ding W-X. Role of Intracellular Calcium in Proteasome Inhibitor-Induced Endoplasmic Reticulum Stress, Autophagy, and Cell Death. *Pharmacol Res* (2013) 30: 2279–2289;
114. Wong DPK., Chu JMT., Hung VKL., Lee DKM., Cheng CHK., Yung KKL., Yue KKM. Modulation of endoplasmic reticulum chaperone GRP78 by high glucose

- in hippocampus of streptozotocin-induced diabetic mice and C6 astrocytic cells. *Neurochem Intern* (2013) 63: 551–560;
115. Wu H., Ding Z., Hu D., Sun F., Dai C., Xie J., Hu X., Central role of lactic acidosis in cancer cell resistance to glucose deprivation-induced cell death. *J Pathol* (2012) 227: 189-199;
116. Wyatt AR., Yerbury J., Berghofer P., Greguric I., Katsifis A., Dobson C., Wilson MR. Clusterin facilitates in vivo clearance of extracellular misfolded proteins. *Cell Mol Life Sci* (2011) 68: 3919-3931;
117. Xi H., Kurtoglu M., Liu H., Wangpaichitr M., You M, Liu X., Savaraj N., Lampidis TJ. 2-Deoxy-D-glucose activates autophagy via endoplasmic reticulum stress rather than ATP depletion *Cancer Chemother Pharmacol* (2011) 67: 899-910;
118. Xing X., Li Y., Liu H., Wang L., Sun L. Glucose regulated protein 78 (GRP78) is overexpressed in colorectal carcinoma and regulates colorectal carcinoma cell growth and apoptosis. *Acta Histochem* (2011) 113: 777-782;
119. Xiong H., Guo X., Bu X, Zhang S., Ma N, Song J., Hu F., Tao S., Sun K., Li R., Wu M., Wei L. Autophagic cell death induced by 5-FU in Bax or PUMA deficient human colon cancer cell. *Cancer Lett* (2010) 288: 68–74;
120. Xu C., Bailly-Maitre B., Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* (2005) 115: 2656–2664;
121. Yang KC., Tsai CY., Wang YJ., Wei PL., Lee CH., Chen JH., Wu CH., Ho YS. Apple polyphenol phloretin potentiates the anticancer actions of paclitaxel through induction of apoptosis in human hep G2 cells. *Mol Carcinog* (2009) 48: 420-31;
122. Zabłocki K., Bandorowicz-Pikuła J. Homeostaza wapnia w komórce zwierzęcej – w zarysie. *Post Biochem* (2012) 58: 387-392;

123. Zawadzki A., Liu Q, Wang Y., Melander A., Jeppsson B., Thorlacius H. Verapamil inhibits L-type calcium channel mediated apoptosis in human colon cancer cells. *Dis Colon Rectum* (2008) 51: 1696-702;
124. Zhang D., Li J., Wang F., Hu J., Wang S., Sun Y. 2-Deoxy-D-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy. *Cancer Lett* (2014) 355: 176–183;
125. Zhang F., Kumano M., Beraldi E., Fazli L., Du C., Moore S., Sorensen P., Zoubeidi A., Gleave ME. Clusterin facilitates stress-induced lipidation of LC3 and autophagosome biogenesis to enhance cancer cell survival. *Nat Commun* (2014) 5: 5775, doi: 10.1038/ncomms6775;
126. Zhang R., Chung Y., Kim HS., Kim DH., Kim HS., Chang WY., Hyun JW. 20-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyl)-20(S)-protopanaxadiol induces apoptosis via induction of endoplasmic reticulum stress in human colon cancer cells. *Oncol Rep* (2013) 29: 1365-1370;
127. Zhang Y., Zhang J., Jiang D., Zhang D., Qian Z., Liu C., Tao J. Inhibition of T-type  $Ca^{2+}$  channels by endostatin attenuates human glioblastoma cell proliferation and migration. *Br J Pharmacol* (2012) 166: 1247–1260;