

# Utjecaj glukoze i glutamina na razinu fosfoglicerat-dehidrogenaze u zloćudno promijenjenim stanicama čovjeka in vitro

---

Osredečki, Mia

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:203902>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-28**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
„Istraživanje i razvoj lijekova“

Mia Osredečki

**Utjecaj glukoze i glutamina na razinu fosfoglicerat-dehidrogenaze u  
zloćudno promijenjenim stanicama čovjeka *in vitro***

Diplomski rad

Rijeka, 2021. godine

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
„Istraživanje i razvoj lijekova“

Mia Osredečki

**Utjecaj glukoze i glutamina na razinu fosfoglicerat-dehidrogenaze u  
zloćudno promijenjenim stanicama čovjeka *in vitro***

Diplomski rad

Rijeka, 2021. godine

Mentor: izv. prof. dr. sc. Koraljka Gall Trošelj, dr. med.

Komentor: izv. prof. dr. sc. Rozi Andretić Waldowski

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY  
Graduate programme  
"Drug research and development"

Mia Osredečki

**The impact of glucose and glutamine on the level of  
phosphoglycerate-dehydrogenase in human malignant cells *in vitro***

Master's thesis

Rijeka, 2021

Mentor: Associate Professor Koraljka Gall Trošelj, MD, PhD

Co-Mentor: Associate Professor Rozi Andretić Waldowski, PhD

Diplomski rad obranjen je dana 29.9.2021. pred povjerenstvom :

1. Prof. dr. sc. Anđelka Radojčić Badovinac (predsjednica povjerenstva)

2. Izv. prof. dr. sc. Ivana Ratkaj (član)

3. Izv. prof. dr. sc. Rozi Andrečić Waldowski (komentor/član)

4. Izv. prof. dr. sc. Koraljka Gall Trošelj, dr. med. (mentor/član)

Rad ima 59 stranica, 15 slika i 61 literaturni navod.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za epigenomiku i financiran je sredstvima Hrvatske zaklade za znanost, u sklopu istraživačkog projekta NRF2 na raskrižju epigenetičkog modeliranja, metabolizma i proliferacije stanice raka (CrossEMPATICNRF2; IP-2016-06-4404). Voditeljica projekta: dr. sc. Koraljka Gall Trošelj, znanstvena savjetnica.

## ZAHVALA

*Želim se zahvaliti svojoj dragoj mentorici dr. sc. Koraljki Gall Trošelj na pruženoj prilici, uloženom trudu, strpljivosti i svemu što me naučila. Hvala Vam na ukazanom povjerenju, savjetima u vezi pisanja i pristupa problemu te vremenu koje ste za mene izdvojili unutar i izvan svog radnog vremena.*

*Zatim se želim zahvaliti asistentici Anamariji na vrlo ugodnom društvu i pozitivnom stavu te na tome što je uvijek bila spremna pomoći i imala strpljenja za sva moja smisljena i besmisljena pitanja. Hvala cijelom Laboratoriju za epigenomiku na pozitivnom radnom okruženju.*

*Zahvaljujem se svojoj obitelji na svoj podršci i razumijevanju koje su mi pružili tijekom studija, ali i inače u životu.*

*Hvala i svim mojim prijateljima i kolegama koji su mi uljepšali dane studiranja.*

## SAŽETAK

Zloćudni tumori nastaju zbog poremećaja regulacijskih mehanizama, neophodnih za rast i dijeljenje stanice. Nerijetko su im u podlozi nastanka mutacije u različitim genima, najčešće protoonkogenima i tumorsupresorskim genima. Početak zloćudne preobrazbe povezan je s nastankom klona brzoproliferirajućih stanica, na koji se nastavljaju evolucija i selekcija klonova s najsnažnijim replikacijskim potencijalom. Zloćudni tumori posjeduju deset temeljnih obilježja, među kojima je i reprogramirani metabolizam. Metabolička aktivnost stanica zloćudnog tumora promijenjena je u odnosu na zdrave stanice od kojih je tumor nastao, a naročito se intenzivno istražuje u odnosu na metabolizam glukoze i glutamina. Za razliku od zdravih stanica koje svoje metaboličke puteve preusmjeravaju u glikolizu u anaerobnim uvjetima, stanice zloćudnih tumora sklone su metaboliziranju velikih količina glukoze glikolizom u uvjetima u kojima je opskrba kisikom optimalna. Ovaj se fenomen naziva aerobna glikoliza ili Warburgov učinak. Osim glukoze, stanice zloćudnih tumora imaju i veliku potrebu za glutaminom, koji služi kao izvor dušika u biosintetskim reakcijama. Biosinteza i iskorištavanje serina u metabolički reprogramiranim stanicama smatra se iznimno važnim za njihovu proliferaciju. Prvi enzim biosinteze serina je fosfoglicerat dehidrogenaza (PHGDH), čija je povećana ispoljenost, kao posljedica amplifikacije dijela kromosoma, dokazana u nekim vrstama zloćudnih tumora. Cilj ovog istraživanja bio je provjeriti postojanje stanično specifične ispoljenosti PHGDH na razini transkripta (RT-qPCR), proteina i u odnosu na unutarstanični smještaj proteina (Western blot), u odgovoru na dvije vrste gladovanja, u tri linije stanica podrijetlom od tumora glave i vrata, te debelog crijeva. Rezultati pokazuju da se ispoljavanje ciljnog proteina u sve tri linije stanica pojačava u gladovanju. Ova promjena može (FaDu), i ne mora (Detroit562, HT29) biti praćena povećanjem transkripcijske aktivnosti gena *PHGDH*. Neočekivano je otkriveno da u linijama stanica podrijetlom od tumora glave i vrata (FaDu,



Detroit562), PHGDH u gladovanju ulazi u jezgru, dok ovaj fenomen izostaje u stanicama podrijetlom od karcinoma debelog crijeva (HT29).

**Ključne riječi:** linije stanica, zloćudni tumori, metabolizam, glukoza, glutamin, serin, fosfoglicerat dehidrogenaza, transkripcijska aktivnost, protein

## SUMMARY

The occurrence of malignant tumors is consequential to disturbed regulatory mechanisms that are needed for cellular growth and division. Mutations of protooncogenes and tumor suppressor genes are frequently associated with their genetic background. Initiation of malignant transformation relates to the onset of a highly proliferative clone, while its evolution depends on the selection of clones with the most prominent replicative potential. Reprogrammed metabolism is one of ten basic cancer hallmarks. Metabolic activity of cancer cells is changed with respect to the cells from which specific cancer originates. Currently, the most intense research efforts are focused on the metabolism of glucose and glutamine. Contrary to untransformed cells which utilize glycolytic pathways when deprived of oxygen, malignant cells utilize a high amount of glucose through the same pathway, even when sufficient oxygen is available. This phenomenon is known as aerobic glycolysis or the Warburg effect. In addition to glucose, malignant cells need glutamine, which they use as a source of nitrogen in biosynthetic reactions. Serine metabolism is considered to be of utmost importance for the proliferation of malignant cells. The first enzyme of serine biosynthesis is phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH). This enzyme is highly expressed in some malignant tumors, as a consequence of chromosome amplification.

The objective of this research was to explore the cellular specific expression of *PHGDH* at the level of the gene transcriptional activity (RT-qPCR), and the level and localization of the protein product, respectively, in three cell lines originating from head and neck malignant tumors and colon carcinoma, exposed to two types of starvation. In all three cell lines, exposure to starvation is associated with an increased level of the PHGDH protein. This change may (FaDu) and may not (Detroit562, HT29) be related to transcriptional activity of the *PHGDH* gene. During starvation, PHGDH unexpectedly translocates into the nucleus of the head and neck originating

cell lines (FaDu, Detroit562), while the effect is absent in colon cancer originating HT29 cells.

**Keywords:** cell lines, malignant tumors, metabolism, glucose, glutamine, serine, phosphoglycerate dehydrogenase, transcriptional activity, protein

## POPIS KRATICA

3-PHP	3-fosfohidroksipiruvat
ACTB	gen za $\beta$ -aktin, od engl. Actin Beta
ADP	adenozin difosfat
APS	amonijev persulfat
ATCC	Američka banka tkiva, od engl. American Type Tissue Collection
ATF4	čimbenik aktiviranja transkripcije 4, od engl. Activating Transcription Factor 4
ATP	adenozin trifosfat
B2M	gen za $\beta$ -2-mikroglobulin, od engl. Beta- 2 Microglobulin
BSA	albumin seruma goveda, od engl. Bovine Serum Albumin
cDNA	komplementarna DNA
CLK	ciklus limunske kiseline
CO <sub>2</sub>	ugljičkov dioksid
CoA	koenzim A
Ct	granična vrijednost, od engl. Cycle Treshold
DMEM	medij za stanice, od engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	deoksiribonukleinska kiselina

DTT	ditiotreitól
E2F	obitelj čimbenika transkripcije E2F
E3	ubikvitin ligaza
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EGF	epidermalni čimbenik rasta, od engl. Epidermal Growth Factor
FBS	serum fetusa goveda, od engl. Fetal Bovine Serum
GAPDH	gen za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu, od engl. Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
gDNA	genomska DNA
HIF-1	hipoksijom potaknut čimbenik rasta 1, od engl. Hypoxia Inducible Factor-1
HMBS	hidroksimetilbilan sintaza, od engl. Hydroxymethylbilane Synthase
HPRT1	hipoksantin fosforiboziltransferaza, od engl. Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1
K58	lizin na položaju 58
K-RAS	protoonkogen sarkoma štakora Kirsten, od engl. Kirsten Rat Sarcoma Gene
MgCl <sub>2</sub>	magnezijev klorid
MHC I	glavni sustav tkivne podudarnosti, od engl. Major Histocompatibility Complex 1

MMLV	reverzna transkriptaza dobivena iz virusa leukemije miša; od engl. Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	glasnička RNA, od engl. Messenger RNA
MTT	test vijabilnosti stanica, od engl. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
NAD+	nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NRF2	čimbenik jezgre 2 sličan eritroidu 2, od engl. Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2
OD	optička gustoća, od engl. Optical Density
pb	par baza (dušičnih baza u nukleinskim kiselinama), od engl. Base Pair (bp)
PBS	fiziološka otopina puferirana fosfatima, od engl. Phosphate-Buffered Saline
PCR	lančana reakcija polimerazom, od engl. Polymerase Chain Reaction
PHGDH	fosfoglicerat dehidrogenaza, od. engl. Phosphoglycerate Dehydrogenase
PKM1/2	izoforma M1 piruvat kinaza M1/2 od engl. Pyruvate Kinase M1/2
PSAT1	fosfoferin aminotransferaza 1, od engl. Phosphoserine Aminotransferase 1
PSPH	fosfoferin fosfataza, od engl. Phosphoserine Phosphatase

qPCR	lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu, od engl. Quantitative Real Time PCR
RB1	gen za protein retinoblastom korepresor transkripcije 1, od engl. RB Transcriptional Corepressor 1
RAS	protoonkogen <i>RAS</i> , od engl. Rat Sarcoma Gene
RIPA	pufer za lizu stanica u radioimunoprecipitacijskom testu, od engl. Radioimmunoprecipitation Assay
RNA	ribonukleinska kiselina
RNF5	E3 ligaza koja sadrži domenu cinkovog prsta (RING), od engl. RING finger E3 ubiquitin ligase
RT	reverzna transkripcija
SDS-PAGE	elektroforeza u gelu poliakrilamida, u prisutnosti natrij dodecil sulfata, od engl. Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis
SIRT2	sirtuin 2
TAE	pufer:Tris-acetat i EDTA
TBP	TATA vezujući protein, od engl. TATA Binding Protein
TBST	fiziološka otopina puferirana Tris s dodatkom polisorbata 20, od engl. Tris-Buffered Saline With 0.1% Tween 20 Detergent
TEMED	tetrametiletildiamin, od engl. Tetramethylethylenediamine
TP53	gen za protein 53, od engl. Tumor Protein P53

Tris-HCl	tris-hidroklorid
UV	ultraljubičasto, od engl. ultraviolet
VEGF	vaskularni endotelni čimbenik rasta, od engl. Vascular Endothelial Growth Factor



# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Zloćudni tumori.....	1
1.2. Mehanizmi nastanka zloćudnih tumora .....	2
1.3. Temeljna obilježja stanica zloćudnog tumora.....	3
1.3.1. Samodostatnost s obzirom na djelovanje čimbenika rasta, neograničen potencijal umnažanja i sklonost lokalnoj invaziji.....	5
1.3.2. Neosjetljivost na signale koji inhibiraju rast .....	5
1.3.3. Autonomna vaskularizacija .....	6
1.3.4. Izbjegavanje apoptoze .....	6
1.3.5. Izbjegavanje imunološkog odgovora i stalno prisutna upala .....	7
1.4. Reprogramiranje metabolizma .....	8
1.4.1. Aerobna glikoliza: Glukoza i glutamin .....	8
1.4.2. L-serin i 3-fosfoglicerat dehidrogenaza (PHGDH, od engl. Phosphoglycerate Dehydrogenase).....	11
2. CILJ RADA .....	13
3. MATERIJALI I METODE .....	14
3.1. Kulture stanica i uvjeti rasta .....	14
3.2. Određivanje vijabilnosti stanica .....	15
3.3. Analize na razini RNA.....	16
3.3.1. Izdvajanje ukupne RNA.....	16
3.3.2. Elektroforeza RNA u gelu agaroze .....	17
3.3.3. Pročišćavanje ukupne RNA od preostale genomske DNA (gDNA) ..	17
3.3.4. Obrnuto prepisivanje (reverzna transkripcija, RT).....	17
3.3.5. Lančana reakcija polimerazom (PCR, od engl. Polymerase Chain Reaction).....	19
3.3.6. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (od engl. Real Time PCR, qPCR) .....	21
3.4. Analize na razini proteina.....	24

3.4.1. Izdvajanje ukupnih proteina .....	24
3.4.2. Izdvajanje proteina jezgre i citoplazme.....	24
3.4.3. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu.....	25
3.4.4. Analiza metodom Western blot.....	26
3.5. Statistička obrada podataka .....	28
4. REZULTATI .....	30
4.1. Određivanje vijabilnosti stanica.....	30
4.2. Kvantificiranje ukupne RNA i proteina .....	30
4.2.1 Kvantificiranje i provjera kvalitete ukupne RNA.....	30
4.2.2. Kvantificiranje transkripta PHGDH metodom RT-qPCR.....	35
4.2.1 Kvantificiranje proteina.....	37
4.3. Western blot .....	39
4.3.1 Elektroforeza i prijenos proteina na membranu .....	39
4.3.2. Izraženost proteina PHGDH.....	41
4.3.3. Kvantifikacija proteina.....	42
5. RASPRAVA .....	46
5.1. Test MTT i njegova interpretacija .....	46
5.2. Gladovanje i promjena ispoljavanja PHGDH na razini transkripta i proteina .....	46
5.2.1. Promjena transkripcijske aktivnosti.....	46
5.2.2 Promjena razine proteina .....	48
5.3. Odnos transkripta i proteina PHGDH u odnosu na uvjete gladovanja ..	49
6. ZAKLJUČAK .....	51
7. LITERATURA.....	52

# 1.UVOD

## 1.1. Zloćudni tumori

Zloćudni tumori su složena tkiva sastavljena od nekoliko različitih vrsta stanica koje su u stalnoj interakciji (1). Zloćudno promijenjene stanice vezane su uz stromu tumora, u kojoj se nalaze netumorske stanice, kao što su stanice imunološkog sustava i fibroblasti (2). Tumori nastaju kao posljedica poremećaja regulacijskih mehanizama koji su neophodni za rast i dijeljenje stanice, a uključuju procese povezane s prijenosom signala, regulacijom životnog ciklusa stanice i kontrolom njezine programirane smrti (apoptoza) (3). Osnovna razlika između zloćudnih i dobroćudnih tumora vezana je uz sposobnost invazije (lokalno) i metastaziranja (limfom i krvlju). Dobroćudni tumori rastu lokalno i nisu skloni metastaziranju. Zloćudni tumori, u pravilu pokazuju svojstva lokalnog invazivnog rasta i metastaziraju; lokalno se šire na zdravo okolno, tkivo, a krvnim i limfnim sustavom na udaljena tkiva i organe. Uvriježen naziv za zloćudne tumore je „rak“.

Zloćudni tumori mogu se podijeliti na karcinome, sarkome te leukemije ili limfome, a detaljnije se klasificiraju u odnosu na tkivo iz kojeg su nastali. Karcinomi, koji čine 90% svih zloćudnih tumora u ljudi, su zloćudni tumori epitelnih stanica. Sarkomi nastaju od stanica vezivnog tkiva, a leukemije i limfomi su tumori krvotvornih stanica te stanica imunološkog sustava (1).

Stanice zloćudnog tumora nerijetko posjeduju velik broj mutacija, u različitim genima. Ove mutacije mogu biti nasljedne i nenasljedne. Mogu nastati djelovanjem egzogenih čimbenika, na primjer - kao posljedica djelovanja mutagena, ili endogeno - zbog pogreške koja se može javiti prilikom replikacije molekule DNA.

U zloćudnim se tumorima mutacije najčešće nalaze u tumorsupresorskim genima i onkogenima (pokretačke mutacije).

## 1.2. Mehanizmi nastanka zloćudnih tumora

Proces nastajanja tumora (karcinogeneza) može biti potaknut kemijskim, fizikalnim ili biološkim čimbenicima. Nastanak zloćudnog tumora povezan je s dva bliska patofiziološka procesa; otpočinjanje (inicijacija) i napredovanje (progresija). Smatra se da je inicijacija posljedica genetičke promjene koja za početnu posljedicu ima nekontroliranu proliferaciju stanice. Zbog toga nastaje klon brzoproliferirajućih stanica koje, nakupljanjem mutacija tijekom vremena, postaju različite i dolazi do pojave novih klonova. Ovaj je proces poznat kao evolucija klona, koji je nedjeljiv od procesa selekcije klona. Selekcijom neki klonovi stanica tumora postanu dominantni u ukupnoj populaciji stanica tumora, zbog toga što imaju sposobnosti bržeg rasta, i izbjegavaju mehanizme uključene u nastanak programirane smrti stanice (4). Zbog klonske selekcije i evolucije, stanice u zloćudnim tumorima se razlikuju genotipom i fenotipom. Zbog toga su uznapredovali zloćudni tumori heterogeni. Zbog nakupljanja mutacija, tijekom progresije, njihova se slika značajno mijenja (5).

Za nastanak raka ključnu ulogu imaju onkogeni i tumorsupresorski geni. Promjene protoonkogeni i tumorsupresorskih gena mogu biti prisutne u zametnim stanicama, ili nastati tijekom života kao posljedica vanjskih čimbenika. Vanjski čimbenici koji dovode do promjena u ovim genima mogu biti povezani s načinom života (čimbenici okoline, čimbenici povezani s profesionalnom izloženošću) te biološki čimbenici (6).

Onkogeni su izmijenjena inačica gena koji su u fiziološkim uvjetima aktivni u zdravim stanicama - protoonkogeni. Proteinski produkti nekih protoonkogeni, kao što je skupina gena *RAS*, prenose signal od stanične membrane do čimbenika transkripcije, koji utječu, ili mogu utjecati, na ispoljavanje velikog broja gena. U zdravim stanicama, proteini *RAS* su neophodni za održavanje homeostaze i regulaciju proliferacije, diferencijacije i preživljenja stanica. Aktivacija protoonkogeni događa se zbog mutacija,

amplifikacije, ili translokacije kromosoma. Aktiviranjem protoonkogeni nastaje onkogen koji kodira nastanak onkoproteina koji je aktivniji od istoimenog protoonkoproteina, i uključen u nekontrolirani rast i diobu stanice (7).

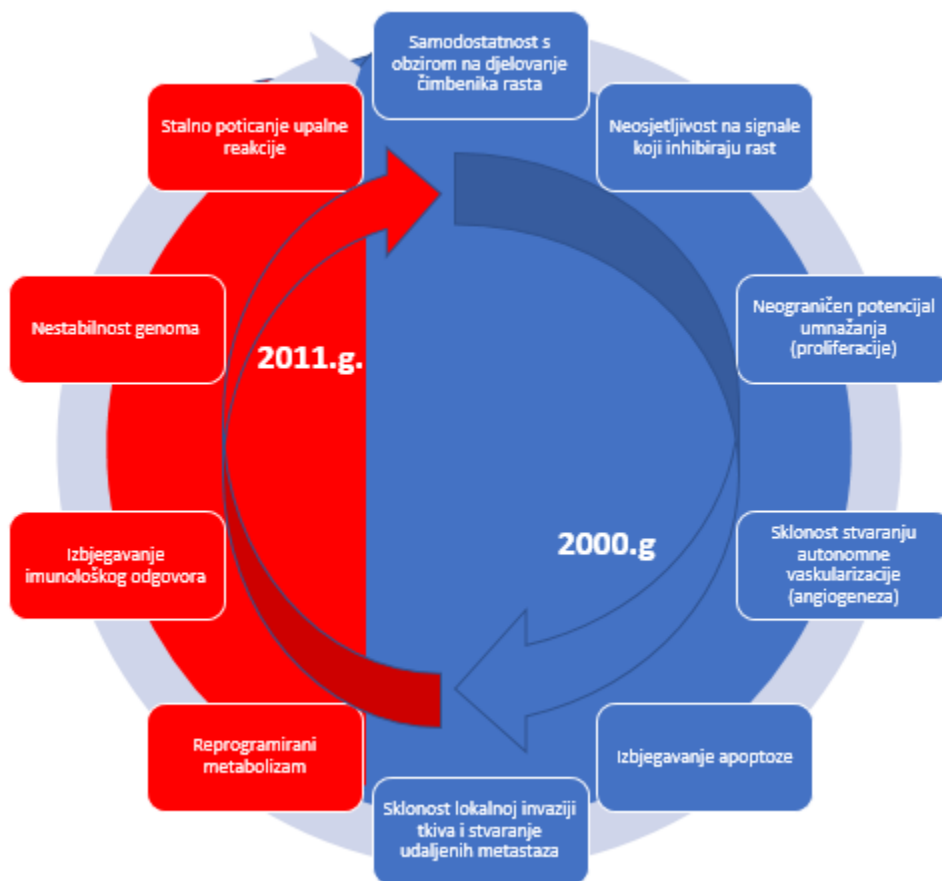
Tumorsupresorski geni doprinose tumorigenezi kada posjeduju mutacije koje umanjuju aktivnost/djelovanje njihovih proteinskih produkata. Inaktivacija jednog, ili oba alela, može znatno doprinijeti nastanku zloćudnog tumora. Osim inaktivirajućim mutacijama, tumorsupresorski geni mogu se utišati i epigenetskim mehanizmima, odnosno promjenama koje utječu na ispoljavanje gena, a koje nisu povezane s promjenama u slijedu baza DNA. Najčešće se radi o prekomjernoj metilaciji njihovih promotorskih regija (8). Najčešće promijenjeni tumorsupresorski geni, u karcinomima ljudi, su *RB1* (kodira za protein retinoblastom, poznat i kao *RB1 transcriptional corepressor 1*) (9) i *TP53* koji kodira istoimeni protein, TP53 (10).

Genomska nestabilnost, odnosno gubitak kontrole integriteta genoma, česta je u zloćudno promijenjenim stanicama, a posljedica je amplifikacije i gubitka brojnih lokusa kromosoma. Česte amplifikacije i delecije određenih lokusa na kromosomima ukazuju na to da se na tim mjestima, vrlo vjerojatno, nalaze protoonkogeni, odnosno tumorsupresorski geni (11). Osim ovih, dobro poznatih molekularno-genetičkih obilježja zloćudno promijenjene stanice, u novije se vrijeme spoznala važnost njezine metaboličke prilagodljivosti, koja je još 2011. godine predložena kao novo obilježje („hallmark“) (1).

### **1.3. Temeljna obilježja stanica zloćudnog tumora**

Godine 2000., šest temeljnih obilježja stanica zloćudnog tumora, koja im omogućuju da prežive, dijele se i šire u udaljene organe, prepoznata su kao „Hallmarks of Cancer“ (3). Obuhvaćaju samodostatnost s obzirom na djelovanje čimbenika rasta, neosjetljivost na signale koji inhibiraju rast,

neograničen potencijal umnažanja (proliferacije), sklonost stvaranju autonomne vaskularizacije (angiogeneza), izbjegavanje apoptoze, sklonost lokalnoj invaziji tkiva i metastaziranju. Jedanaest godina kasnije, prepoznata su četiri dodatna obilježja: reprogramirani metabolizam, izbjegavanje imunološkog odgovora, i nestabilnost genoma uz stalno potaknutu reakciju upale (slika 1).



**Slika 1:** Deset temeljnih obilježja zloćudnih tumora (1, 3)

Zloćudno promijenjene stanice su vrlo prilagodljive uvjetima okoliša („plastične“ su) te nerijetko preživljavaju i dijele se koristeći visokospecifične molekularne mehanizme (12, 13).

### *1.3.1. Samodostatnost s obzirom na djelovanje čimbenika rasta, neograničen potencijal umnažanja i sklonost lokalnoj invaziji*

S nekontroliranom proliferacijom povezan je izostanak diferencijacije. Diobeni potencijal diferenciranih stanica je vrlo malen. S obzirom na to da zloćudno promijenjene stanice nisu diferencirane, njihova sposobnost proliferacije je iznimno visoka. Osim toga, većina stanica tumora sintetizira i izlučuje enzime koji razgrađuju izvanstanični matriks, što im omogućuje lokalno širenje i invazivan rast (3). U odnosu na zdrave stanice, stanice zloćudnih tumora često prekomjerno ispoljuju receptore za čimbenike rasta na svojoj površini, što ih čini iznimno osjetljivima već na mali broj molekula čimbenika rasta (14).

Većina, ili čak svi antiproliferativni signali se na molekularnoj razini usmjeravaju kroz protein retinoblastoma, RB1. Hipofosforilirani RB1 na sebe veže čimbenike transkripcije E2F (skupina čimbenika transkripcije viših eukariota), koji kontroliraju ispoljenost gena čiji su proteinski produkti važni za napredovanje ciklusa stanice iz faze G1 u fazu S. Poremećaj u prijenosu signala koji rezultira fosforilacijom proteina RB1 za posljedicu ima oslobađanje čimbenika transkripcije E2F i poticanje ciklusa stanice, koji rezultira njezinom proliferacijom (15).

### *1.3.2. Neosjetljivost na signale koji inhibiraju rast*

Većina stanica tumora u uvjetima *in vitro* raste u nekoliko slojeva, zbog nepostojanja dodirne inhibicije, koja je osobina zdravih, ali ne i tumorskih stanica. Nakon što zdrave stanice dođu u kontakt sa susjednom stanicom, njihova se migracija zaustavlja, adheriraju i rastu u jednom sloju. Stanice tumora se, neovisno o kontaktu sa susjednim stanicama, nastavljaju kretati, migriraju jedna preko druge i rastu u nekoliko slojeva. Rezultat smanjene adhezivnosti tumorskih stanica je i promjena njihovog oblika, pa su tako stanice tumora često zaobljenije od zdravih stanica (16).

### *1.3.3. Autonomna vaskularizacija*

Stanice zloćudnih tumora izlučuju čimbenike koji potiču angiogenezu, odnosno stvaranje novih krvnih žila u samom tumoru (17). Za razumijevanje angiogeneze, važno je razumjeti pojmove vaskulogeneze i neovaskularizacije. Vaskulogeneza je proces kojim stanice endotela diferenciraju od stanica prekursora endotela i stvaraju lumen. Neovaskularizacijom iz postojećih krvnih žila nastaju nove, nakon proliferacije i migracije endotelnih stanica. Ovaj proces reguliraju čimbenici rasta koji potiču angiogenezu, na primjer VEGF (od engl. Vascular Endothelial Growth Factor) (18). U pravilu, nakon što tumor naraste do promjera 0,2 mm, količina kisika i hranjivih tvari koju prima difuzijom prestaje zadovoljavati njegove potrebe. Zbog toga stanice zloćudnih tumora počinju ispoljavati HIF-1 (od engl. Hipoxia Inducible Factor-1), koji potiče ispoljavanje različitih angiogenih proteina, koji potiču hipervaskularizaciju (19). U angiogenezi sudjeluju stanice endotela krvnih žila, stanice tumora te stanice strome tumora (2). U odnosu na normalne krvne žile, krvne žile zloćudnog tumora su proširene, vrećaste i propusne. Zbog toga u tumoru postoji povišen intersticijski tlak, čime se dodatno smanjuje prokrvljenost tumora i potencira hipoksija njegovog mikrookoliša (18).

### *1.3.4. Izbjegavanje apoptoze*

Životni vijek stanica tumora je duži u odnosu na zdrave stanice zbog izbjegavanja mehanizama programirane stanične smrti - apoptoze, procesa koji se manifestira kroz senzorske i efektorske učinke (3). „Senzorima“ se prate uvjeti u stanici, a programirana smrt stanice aktivira se kao odgovor na različite abnormalnosti (oštećenje DNA, postojanje signala nastalih djelovanjem onkoproteina, hipoksija). Proteini-efektori uključeni su u realiziranje programirane smrti stanice. Neosjetljivost na apoptozu je u



karcinomima najčešće postignuta mutacijama tumorsupresorskog gena *TP53*, zbog čega se inaktivira funkcija istoimenog proteina, koji je ključan za detekciju oštećenja DNA i poticanje proteina-efektora apoptoze (20).

#### *1.3.5. Izbjegavanje imunološkog odgovora i stalno prisutna upala*

Duljini životnog vijeka stanica tumora pridonosi i utjecaj imunološkog sustava, koji ima dvojak utjecaj: eliminaciju, i poticanje rasta i dijeljenja stanica tumora. Nerijetko stanice tumora ispoljavaju površinske antigene koji su različiti od antigena tkiva iz kojih su nastale, a koje stanice imunološkog sustava mogu prepoznati kao strane i potaknuti imunološku reakciju. S druge strane, u imunološkim reakcijama javlja se snažna upalna reakcija, koja ima pro-proliferativni učinak (21). Tijekom normalnog zacjeljivanja rana i borbe protiv infekcija, upalne stanice imunološkog sustava pojavljuju se, a zatim nestaju. Međutim, na mjestima kronične upale (na primjer, u plućima pušača), njihova je stalna prisutnost povezana s različitim patološkim stanjima, uključujući i neoplaziju (22). Upalne stanice, makrofagi, mastociti, neutrofili te limfociti T i B, infiltriraju tkivo tumora (2). Ove stanice sudjeluju u sintezi čimbenika rasta EGF (od engl. Epidermal Growth Factor), VEGF i različitih pro-proliferativnih kemokina i citokina. Zloćudno promijenjene stanice razvijaju mehanizme kojima izbjegavaju nadzor imunološkog sustava. Mogu smanjiti ili u potpunosti eliminirati ispoljavanje specifičnih antigena i molekula MHC I. Zbog toga ih citotoksični limfociti T ne mogu prepoznati. Dodatno, imaju i mogućnost privlačenja regulacijskih limfocita T, koji, posljedično, inhibiraju imunološku reakciju. Prepreku učinkovitom imunološkom odgovoru predstavlja mikrookruženje tumora koje je, u pravilu, hipoksično i kiselog pH (21).

## **1.4. Reprogramiranje metabolizma**

### *1.4.1. Aerobna glikoliza: Glukoza i glutamin*

Aktivacija protoonkogeni i gubitak funkcije tumorsupresorskih gena dovodi i do promijenjene metaboličke aktivnosti stanica tumora, u odnosu na zdrave stanice (23). Reprogramirani metabolizam zloćudno promijenjene stanice omogućuje selektivnu prednost rasta koji omogućuje opstanak u uvjetima stresa te pridonosi proliferaciji stanica. U nedostatku glukoze i /ili drugih hranjivih sastojaka, stanice tumora prilagođavaju se mikrookruženju smanjenjem potrebe za adenozin trifosfatom (ATP) (1). U zdravom tkivu je glikoliza fiziološki odgovor na hipoksiju. Stanica tumora koristi glikolizu i u slučaju kada nije izložena manjku kisika, pri čemu pretvara piruvat u laktat posredovanjem enzima laktat dehidrogenaze (24)

Otto Warburg je primijetio da stanice tumora koriste glukozu za proizvodnju laktata, neovisno o raspoloživosti kisika (25). Danas se zna da je aerobna glikoliza ili Warburgov učinak ključna značajka metabolizma stanice tumora (1). Zbog prisustva ovog fenomena dugo se smatralo da stanice zloćudnih tumora imaju disfunkcionalne mitohondrije.

Zloćudni, brzoproliferirajući tumori imaju visoku stopu korištenja glukoze. Ovaj je fenomen dokumentiran u mnogim zloćudnim tumorima, metodom pozitronske emisijske tomografije, koja koristi radioaktivni analog glukoze, fluorodeoksiglukozu, za prikaz unosa glukoze u tumore i susjedno zdravo tkivo (26). Velik broj stanica tumora ima i sposobnost proizvodnje energije oksidacijom glukoze (ugljik dobiven iz glukoze ulazi u ciklus limunske kiseline (CLK) i oksidira u CO<sub>2</sub>, pri čemu nastaje ATP) (27). U aerobnim uvjetima, zdrave stanice najprije koriste glukozu da bi dobile piruvat glikolizom u citosolu, a zatim ga u ciklusu limunske kiseline, u mitohondrijima, prevode u ugljikov dioksid. U anaerobnim uvjetima, glikoliza je pojačana i relativno malo

piruvata odlazi u mitohondrije koji troše kisik, kako bi nastao laktat. Zloćudno promijenjene stanice imaju veliku sposobnost za stvaranje laktata (1).

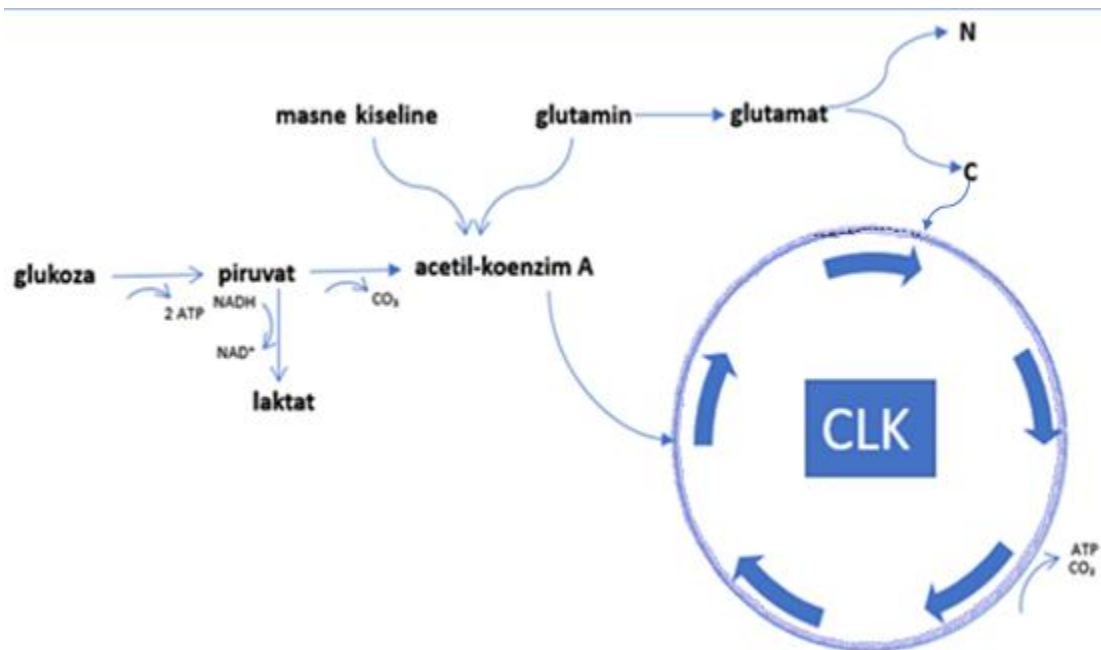
Piruvat kinaza je ključan enzim glikolize, koji katalizira prijenos fosforilne skupine na ADP, čime nastaje piruvat i ATP (28). Postoje dvije izoforme piruvat kinaze; M1 i M2. PKM1 je dominantna izoforma u zdravim stanicama, dok je PKM2 dominantna izoforma u visokoproliferirajućim stanicama zloćudnog tumora (28, 29). Dokumentirana je reducirana proizvodnja laktata inhibiranjem izoforme M2, što ukazuje na značaj PKM2 u metabolizmu zloćudno promijenjene stanice (30).

U uvjetima *in vitro*, nakon glukoze, stanice tumora najviše troše glutamin (31). Potreba za glutaminom se, između pojedinih linija stanica uzgojenih u kulturi, može značajno razlikovati. Neke linije stanica tumora mogu preživjeti i dijeliti se bez prisutnosti glutamina (stanice melanoma, karcinoma jetre, glioblastoma, karcinoma prostate), a neke ne (stanice karcinoma pluća, debelog crijeva, želuca, dojke).

Glutamin je neesencijalna aminokiselina, što znači da je stanice sisavaca mogu sintetizirati *de novo*. Prvi korak u metaboličkoj pretvorbi glutamina je njegova pretvorba u glutamat, koja je katalizirana glutamin amidotransferazama iz citosola ili glutaminazama iz mitohondrija (32). Glutamat u proliferirajućim stanicama služi kao izvor dušika za reakcije transaminacije te izvor ugljika za sintezu prekursora CLK, proizvodnju glutationa, sintezu lipida te sintezu prekursora nukleotida (33).

Glutamin je važan u anaplerotskim reakcijama, zbog kojih je koncentracija međuprodukata CLK, koji se koriste kao supstrati u biosintetskim reakcijama, uglavnom konstantna unutar mitohondrija. Ako je oksidacija piruvata u acetyl-CoA onemogućena zbog hipoksije ili oštećenja respiratornog lanca, iz glutamina se može sintetizirati acetyl-CoA pomoću glutamat dehidrogenaza ili transaminaza. Osim piruvata i glutamina, druge aminokiseline i masne kiseline

mogu opskrbiti CLK potrebnim supstratima kako bi održale proizvodnju ATP u mitohondrijima zloćudno preobražene stanice (slika 2) (34).

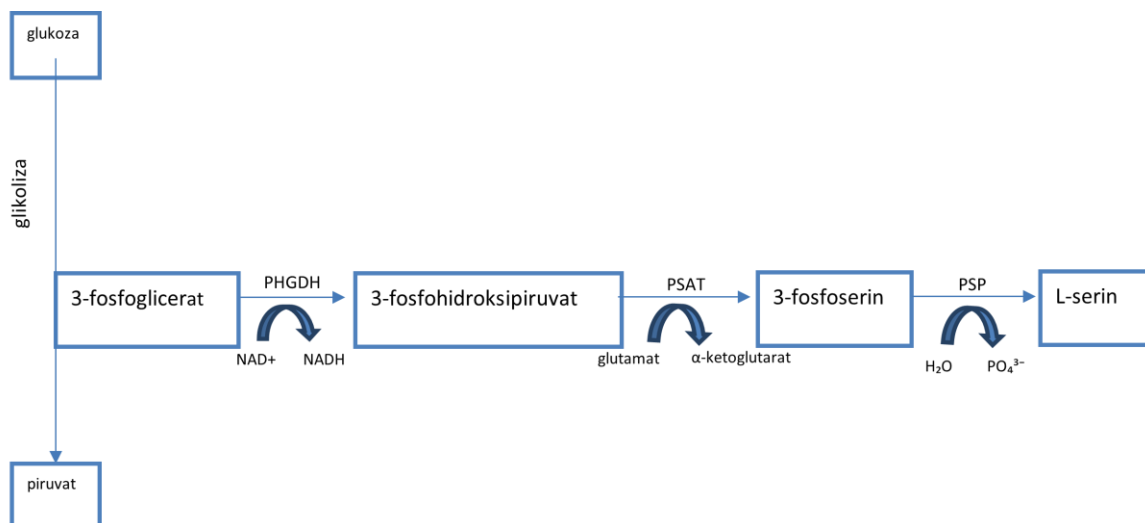


**Slika 2:** Pojednostavljeni prikaz metabolizma glukoze i glutamina u zloćudno promijenjenoj stanici.

Prilagodljivost tumora na promjenu uvjeta rasta reprogramiranim metabolizmom, može se primijeniti i u situacijama gladovanja. U uvjetima kada je glukoza dostupna, nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) se stvara pentoza fosfatnim putem. U slučaju nedostatka glukoze, smanjuje se stvaranje ATP i NADPH, što može izazvati oksidacijski stres. Reprogramirani metabolizam dodatno aktivira signale kojima se sprečava prekomjerna potrošnja NADPH u sintezi masnih kiselina. U isto se vrijeme pojačano oksidiraju masne kiseline, kako bi se sintetiziralo što više NADPH (35).

#### 1.4.2. L-serin i 3-fosfoglicerat dehidrogenaza (PHGDH, od engl. Phosphoglycerate Dehydrogenase)

Serin je neesencijalna aminokiselina čija je važnost za proliferativni potencijal zloćudno promijenjene stanice postao predmet intenzivnog istraživanja. Danas se zna da L-serin ili 2-amino-3-hidroksipropionska kiselina ima središnju ulogu u proliferaciji stanica. U uvjetima *in vitro*, zloćudno preobražena stanica koristi velike količine izvanstaničnog serina. Istovremeno prilagođava svoj biosintetski aparat za unutarstanično stvaranje ove aminokiseline, *de novo* (36). Glukoneogeneza tijekom gladovanja posreduje u sintezi velike količine (do 70%) serina u stanicama glodavaca (37). Fosfoglicerat dehidrogenaza (PHGDH, od engl. Phosphoglycerate Dehydrogenase) prvi je enzim u sintezi serina. Njegova katalitička aktivnost posreduje u NAD<sup>+</sup>-ovisnoj reakciji pretvorbe 3-fosfoglicerata (nastalog glukoneogenezom ili glikolizom), u 3-fosfohidroksipiruvat (3-PHP) koji se prevodi u fosfoserin djelovanjem fosfoserin aminotransferaze 1 (PSAT1), a potom u serin djelovanjem fosfoserin fosfataze (PSPH) (slika 3).



**Slika 3:** Shematski prikaz puta biosinteze serina.

Serin aktivira PKM2, a njegov nedostatak odražava se na smanjenoj aktivnosti ovog enzima (38, 39). Gen koji kodira protein *PHGDH* nalazi se na kratkom kraku prvog kromosoma (1p12:119,711,934-119,744,218), na kojem zauzima 32285 parova baza genomske DNA i sadrži 16 eksona (40). Sve je više spoznaja o promijenjenoj aktivnosti metaboličkih enzima zbog mutacija ili većih promjena u genomu. Povećana ispoljenost enzima fosfoglicerat dehidrogenaze (*PHGDH*) dokazana je u zloćudnim tumorima dojke i u melanomima (41, 42). Enzim u funkcionalnim esejima pokazuje onkogeno svojstvo, a pojačano je ispoljen zbog amplifikacije kromosomskog lokusa na kojem se nalazi alel *PHGDH*. Inhibiranje biosinteze serina smanjenjem ispoljenja *PHGDH* u stanicama s visokim razinama ovog enzima rezultira smanjenjem stope rasta stanice tumora, neovisno o dostupnom serinu u mediju (43). Utišavanje *PHGDH* za posljedicu ima povećanu osjetljivost stanica na hipoksiju (44).

Snažna transkripcijska aktivnost *PHGDH* pokazana je u karcinomu pluća nemalih stanica, s mutiranim *K-RAS*. Ova onkogeno mutacija potiče signalni put osjetljiv na oksido-redoks status stanice, posredovan čimbenikom transkripcije NRF2 (od engl. Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2). NRF2 neizravno, poticanjem čimbenika transkripcije ATF4 (od engl. Activating Transcription Factor 4), potiče transkripcijsku aktivnost gena *PHGDH* (45).

## 2. CILJ RADA

Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti stanično-specifičan odgovor na gladovanje u odnosu na ispoljenosti PHGDH na razini transkripta i proteina, u tri različite linije zloćudno promijenjenih stanica, *in vitro*. Medij DMEM (od eng. Dulbecco's Modified Eagle Medium) s 4,5 g/L glukoze (UR1) rutinski se koristi u uvjetima *in vitro*, u eksperimentalnoj onkologiji. Međutim, taj medij stanici nudi iznimno visoku, 25 mM, razinu glukoze. S druge strane, medij s niskom razinom glukoze (UR2), puno je bliži fiziološkim uvjetima, s obzirom na to da se stanici nudi približno 5 mM glukoza. Treći zadani uvjet, u kojem stanica teško preživljava koristeći glutamin i glukozu samo iz dodanog 10% seruma (FBS), u potpunosti je neprirodan.

Istraživanja su provedena na linijama stanica karcinoma čovjeka, podrijetlom od tumora glave i vrata te debelog crijeva. Razina PHGDH određena je na razini transkripta, kvalitativno i kvantitativno, a količina ciljnog proteina određena je u jezgri, citoplazmi te ukupnom lizatu stanica. Specifični ciljevi ovog diplomskog rada vezani su uz određivanje:

- 1) Postojanja razlika u vijabilnosti stanica, ovisno o razini glukoze i glutamina u hranjivom mediju, i u odnosu na liniju stanica;
- 2) Postojanja razlika u ispoljenosti *PHGDH* na razini transkripta, ovisno o razini glukoze i glutamina u hranjivom mediju, i u odnosu na liniju stanica;
- 3) Postojanja razlika u ispoljenosti *PHGDH* na razini proteina, ovisno o razini glukoze i glutamina u hranjivom mediju, i u odnosu na liniju stanica;
- 4) Postojanja razlika u unutarstaničnom smještaju proteina PHGDH, u odnosu na uvjete gladovanja, i u odnosu na liniju stanica.

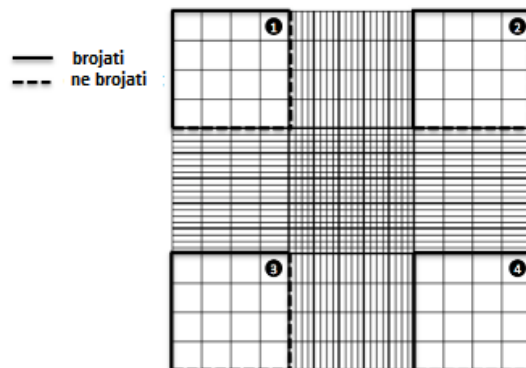
### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Kulture stanica i uvjeti rasta**

Istraživanja su napravljena na adherentnim linijama stanica HT29 (adenokarcinom debelog crijeva), Detroit562 (karcinom ždrijela) te FaDu (karcinom pločastih stanica ždrijela), nabavljenih od ATCC (American Type Tissue Collection). Odmrznute stanice su početno uzgojene u bocama površine 75 cm<sup>2</sup> (Sarstaedt AG&Co.KG), u kompletiranom mediju (DMEM, od engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium) s 4,5 g/L glukoze i seruma fetusa goveda (FBS, od engl. Fetal Bovine Serum) u konačnom udjelu 10%. Potom su rasađene u manje boce (25 cm<sup>2</sup>, Sarstaedt AG & Co. KG) i uzgajane u inkubatoru pri 37°C, u vlažnoj atmosferi obogaćenoj s 5% CO<sub>2</sub>.

Nasađivanje u manje boce započeto je uklanjanjem medija u kojem su stanice rasle. Stanice su potom isprane fosfatnim puferom (PBS, od engl. Phosphate - Buffered Saline, pH = 7,4) i odvojene od podloge otopinom tripsin - EDTA (0,25% Tripsin, 0,02% EDTA) (Sigma-Aldrich). Djelovanje tripsina prekinuto je prebacivanjem stanica u epruvete volumena 15 mL u kojemu je bio svježi kompletirani medij. Stanice su centrifugirane, 250g/4<sup>0</sup>C/5 minuta. Nakon centrifugiranja, supernatant je uklonjen a stanice izbrojane kako bi se u sve boce nasadio jednak broj stanica, jedan milijun. Stanice su resuspendirane u 1 mL kompletiranog medija, a potom je 20 µL suspenzije stanica pomiješano sa 180 µL boje Trypan Blue Solution 0,4% (Sigma Aldrich) i ispipetirano ispod pokrovnog stakalca Bürker-Türkoveg hemocitometra (Brand). Stanice su izbrojane pod mikroskopom, unutar četiri kvadrata koja su označena brojevima na slici 4.





**Slika 4.** Prikaz Bürker-Türk hemocitometra (46)

Za izračun broja stanica u 1 mL suspenzije korištena je formula :

$$\frac{\text{zbroj stanica u 4 kvadrata}}{64} * 250 * 10 * 1000 = \text{broj stanica u 1 mL.}$$

Milijun stanica nasađeno je u tri inačice medija DMEM (Sigma Life Science), s obzirom na koncentraciju glukoze i glutamina, koje su navedene u tablici 1.

**Tablica 1:** Koncentracije glukoze i glutamina u tri inačice hranjivog medija.

	Koncentracija glukoze (g/L)	Koncentracija glutamina (g/L)
Uvjet rasta 1 (UR1)	4,5	0,584
Uvjet rasta 2 (UR2)	1,0	0,584
Uvjet rasta 3 (UR3)	0	0

U ovim su medijima stanice rasle 48 sati.

### 3.2. Određivanje vijabilnosti stanica

Vijabilnost stanica određena je u šesteroplikatu (dvije biološke replike; tehnički triplikat), komercijalno dostupnim kompletom kemikalija EZ4U Cell Proliferation and Cytotoxicity Assay (Biomedica). 10 000 stanica po jažici nasađeno je na pločicu MicroAmp Optical 96-Well Reaction plate (Applied

Biosystems), u 200  $\mu$ L kompletiranog medija. Nakon 48 sati je u svaku jažicu dodano 20  $\mu$ L otopine tetrazolijeve soli.

Tijekom naredna dva sata inkubacije (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), enzimi metabolički aktivnih, živih stanica, reducirali su žute tetrazolijeve soli u crveni derivat formazana. Intenzitet obojenja bio je proporcionalan broju živih stanica (47). Intenzitet obojenja kvantificiran je mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini 450 nm i referentnoj valnoj duljini 620 nm, uređajem Multiskan EX (Thermo Electron Corporation). Vijabilnost stanica izloženih UR2 i UR3 uspoređena je s vijabilnošću stanica izloženih UR1.

### **3.3. Analize na razini RNA**

#### *3.3.1. Izdvajanje ukupne RNA*

U postupku su korišteni nastavci za mikropipete s filterom, a većina procesa odvijala se na ledu. Nakon uklanjanja medija, adheriranim je stanicama dodan 1 mL TRIzola (Ambion). Nakon inkubacije na ledu (5 minuta), sadržaj boca je prebačen u mikroeprovete volumena 2 mL, dodano je 200  $\mu$ L kloroforma (Carlo Erba Reagents) i sadržaj je lagano pomiješan. Nakon 13 minuta inkubacije na ledu, mikroeprovete su centrifugirane na 12000 g/4°C/15 minuta. Gornji bezbojni sloj koji se izdvojio nakon centrifugiranja prebačen je u novu mikroeprovetu i na njega je dodano 500  $\mu$ L izopropanola (Gram-mol). Sadržaj je lagano pomiješan u ruci i inkubiran 10 minuta na ledu. Mikroeprovete su centrifugirane na 12000g/4°C/10 minuta. Supernatant je uklonjen, a na talog je dodano 1,5 mL 75% etanola. Mikroeprovete su kratko vorteksirane i inkubirane preko noći na -20 °C.

Ukupna RNA istaložena je centrifugiranjem 12000g/4°C/5 minuta. Etanol je uklonjen pipetom, a talog resuspendiran u sterilnoj, deioniziranoj vodi (miliQ). Koncentracije RNA u uzorcima izmjerene su korištenjem uređaja BioSpec - nano (Shimadzu Biotech). MiliQ voda je korištena kao slijepa proba.

### *3.3.2. Elektroforeza RNA u gelu agaroze*

Elektroforezom u 1% gelu agaroze određena je kvaliteta ukupne RNA. Za pripremu gela, 0,4 g agaroze (Sigma) otopljeno je u 40 mL pufera TAE (1 X pufer TAE: 40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0), zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici. U tekuću agarozu su, prije izlijevanja u prethodno pripremljeni kalup, dodana 3  $\mu$ L etidij bromida masene koncentracije 0,5  $\mu$ g/mL (Sigma-Aldrich). Uzorci i standard DNA (Lambda DNA HindIII Marker, Sigma-Aldrich) pomiješani su s puferom za nanošenje (engl. Loading Buffer; 5 mL glicerol, 4 mL 1 X pufer TAE, pH 8.0 i 1 mL 1% bromfenolno modriilo) i naneseni u jažice gela. Elektroforeza je trajala sat vremena, na 70 V. Po završetku elektroforeze, gel je izložen djelovanju UV-svjetla. Slika je dokumentirana instrumentom Uvitec BXT-20-M.

### *3.3.3. Pročišćavanje ukupne RNA od preostale genomske DNA (gDNA)*

Potencijalno zaostala genomska DNA uklonjena je korištenjem komercijalno dostupnog kompleta kemikalija gDNA removal kit (Jena Bioscience), prema uputi proizvođača: u mikroepruveti se pomiješa 1,5  $\mu$ L reakcijskog pufera i 1  $\mu$ L enzima DNA-za s 12,5  $\mu$ L uzorka izdvojene RNA. Uzorak se inkubira: 25°C/20 min (na ovoj temperaturi je enzim aktivan), te 58°C/5 min (inaktivacija enzima). Učinkovitost uklanjanja genomske DNA određena je lančanom reakcijom polimeraze, početnicama GAPDH2/GAPDH3.

### *3.3.4. Obrnuto prepisivanje (reverzna transkripcija, RT)*

Obrnuto prepisivanje izvedeno je s kompletom kemikalija High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) te početnicama

Oligo(dT)23 (Sigma-Aldrich). Pripremljen je Master Mix za devet reakcijskih smjesa; tri različita uvjeta rasta, triplicati. Volumen i sastav reakcijske smjese RT Master Mix za devet uzoraka prikazan je u tablici 2.

**Tablica 2:** Smjesa RT Master Mix.

Sastav reakcijske smjese za pojedini uzorak/ $\mu\text{L}$		Sastav smjese RT za devet uzoraka, uvećan za 2%/ $\mu\text{L}$	
Pufer 10XRT	2,0	Pufer 10XRT	18,36
dNTP (100 mM)	0,8	dNTP	7,344
Početnice Oligo dT23 (70 $\mu\text{M}$ )	1,0	Početnice Oligo dT23	9,18
Reverzna transkriptaza RT - MMLV (50 U/ $\mu\text{L}$ )	1,0	Reverzna transkriptaza RT - MMLV	9,18
Inhibitor RNA-za (20 U/ $\mu\text{L}$ )	0,5	Inhibitor RNA-za	4,59
mQ H <sub>2</sub> O	4,7	mQ H <sub>2</sub> O	43,146
Ukupan volumen	10,0	Ukupan volumen	91,8

RT Master Mix je razdijeljen u 9 mikroepreveta za PCR volumena 0,2 mL (Sarstedt). U svaku mikroeprevetu je dodan 1  $\mu\text{g}$  ukupne RNA pomiješane s miliQ vodom do ukupnog volumena 10  $\mu\text{L}$  (ukupni volumen reakcijske smjese bio je 20  $\mu\text{L}$ ). Uvjeti reakcije bili su 25°C/10 min; 37°C/120 min; 85°C/5 min; 4°C/ $\infty$ . Nakon završetka reakcije, u svaku mikroeprevetu je dodano 80  $\mu\text{L}$  miliQ vode (konačni volumen 100  $\mu\text{L}$ ). Učinkovitost reverzne transkripcije dokazana je umnažanjem odsječka gena *GAPDH* (*Glicer aldehid - 3 - fosfat dehidrogenaza*) lančanom reakcijom polimeraze, početnicama GAPDH1/GAPDH2.

### 3.3.5. Lančana reakcija polimerazom (PCR, od engl. Polymerase Chain Reaction)

Lančana reakcija polimerazom korištena je za: a) provjeru prisutnosti preostale gDNA u uzorku ukupne RNA, b) provjeru ispoljavanja gena GAPDH c) provjera ispoljenosti (ima/nema) PHGDH početnicama komplementarnim slijedu nukleotida u eksonima 1 i 2, razdvojenih intronom 1, duljine 8910 pb. Za izvođenje reakcije korišten je komercijalno dostupan komplet kemikalija AmpliTaq Gold™360 DNA Polymerase (1 x 100 U DNA polimeraze AmpliTaq Gold 360, 1 x 1,5 mL 10 x AmpliTaq Gold 360 Buffer, 1 x 1,5 mL 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 x 1,5 mL 360 pojačivača GC Enhancer (Thermo Fisher Scientific)) Master Mix. Sastojci jedne reakcijske smjese s pripadajućim volumenima navedeni su u tablici 3.

**Tablica 3:** Sastav reakcijske smjese PCR.

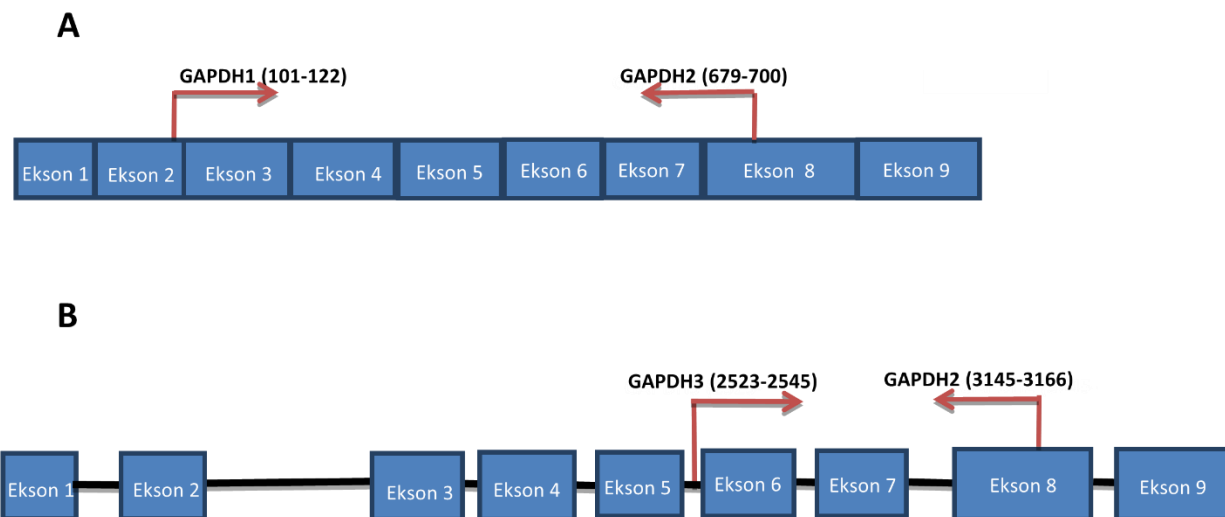
Komponenta reakcijske smjese	Volumen (μL)
AmpliTaQ Gold™ 360 Master Mix	6,25
Pojačivač (engl. Enhancer)	0,3
Početnice(5μM svaka)	1
mQH <sub>2</sub> O	3,95
Uzorak ukupne RNA	1
Ukupni volumen	12,5

Početnice su konstruirane korištenjem programa Primer-BLAST i Primer3Plus, a njihov sastav i očekivane veličine odsječaka prikazani su u tablici 4.

**Tablica 4:** Sljedovi početnica korištenih u reakcijama „endpoint“ PCR s pripadajućim veličinama odsječka.

Naziv početnica	Slijed početnica	Veličina odsječka
GAPDH1	5'AACGGATTTGGTCGTATTGGGC3'	600 pb (mRNA)
GAPDH2	5'AGGGATGATGTTCTGGAGAGCC3'	
GAPDH2	5'AGGGATGATGTTCTGGAGAGCC3'	644 pb (gDNA)
GAPDH3	5'AAGCTGACTCAGCCCGCAAAGG3'	
PHGDH A	5'AGCGGGAGCTGGAGAATAC3'	301 pb (mRNA)
PHGDH B	5'TGACATCAGCGGTCACCTTG3'	

Grafički prikaz mjesta vezanja početnica prikazan je na slici 5. Slika 5A prikazuje mjesta vezanja početnica GAPDH1 i GAPDH2 na kanonskoj transkripcijskoj inačici 1 (mRNA), a slika 5B prikazuje mjesta vezanja početnica GAPDH2 i GAPDH3 na genu *GAPDH*. Eksoni su prikazani plavim pravokutnicima, a introni crnim linijama. Početnica GAPDH1 komplementarna je području koje se nalazi na granici drugog i trećeg eksona (tzv. „flanking“ područje), a početnica GAPDH2 je komplementarna s područjem koje se nalazi unutar osmog eksona.



**Slika 5.** Vežanja početnica GAPDH1, GAPDH2 i GAPDH 3 na : A) transkripcijskoj inačici *GAPDH* 1 (mRNA) i B) genu *GAPDH*.

Uvjeti svih reakcija bili su 95°C/5 min; 30 ciklusa: 95°C/0,30 sek; 59°C/30 sek; 72°C/30 sekundi i 72°C/7 min. Dobiveni uzorci su nanoseni u gel agaroze, na način koji je ranije opisan.

### 3.3.6. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *Real Time PCR, qPCR*)

Metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu, temeljena na interkaliranju boje SYBR®Green (Thermo Fisher Scientific), korištena je za određivanje razine ispoljenosti ciljnog gena, *PHGDH*. Sastav jedne reakcijske smjese prikazan je u tablici 5.

**Tablica 5:** Sastav reakcijske smjese RT-qPCR

Komponenta reakcijske smjese	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
PowerUp SYBR® Green Master Mix	10
Početnice(5 $\mu\text{M}$ )	2
mQH <sub>2</sub> O	7
Uzorak cDNA	1
Ukupni volumen	20

Korišteni su parovi početnica za umnožavanje cDNA gena: *ACTB* za  $\beta$ -aktin, *B2M* za  $\beta$ -2-mikroglobulin, *HPRT1* za hipoksantin fosforiboziltransferazu 1, *HMBS* za hidrosimetilbilan sintazu te *GAPDH* i *PHGDH*, prikazani u tablici 6.

**Tablica 6:** Sljedovi početnica korištenih u reakcijama RT-qPCR s pripadajućim veličinama odsječaka.

Naziv početnica	Slijed početnica	Veličina odsječka
$\beta$ -aktin F	5'GAGCACAGAGCCTCGCCTT3'	196 pb
$\beta$ -aktin R	5'CCCACCATCACGCCCTGG3'	
B2M F	5'TGTCTTTCAGCAAGGACT3'	138 pb
B2M R	5'ACATGTCTCGATCCCACT3'	
GAPDH F	5'GGGGAGCCAAAAGGGTCATC3'	189 pb
GAPDH R	5'TGGTCATGAGTCCTTCCACG3'	
HMBS F	5'GGCAACTGTACCTGACTGGA3'	110 pb
HMBS R	5'CTCAGGGCCATCTTCATGCT3'	
HPRT F	5'CCCTGGCGTCGTGATTAGTG	139 pb
HPRT R	5'TCGAGCAAGACGTTTCAGTCC3'	
PHGDH SYF	5'AAAGAGGAGCTGATAGCGGA'3	107 pb
PHGDH SYR	5'ACCACCTGGAGTTTCTCAGC'3	



Prije pipetiranja na pločicu (The Microamp 96-well rxn plates, Applied Biosystems), reakcijske smjese su vorteksirane i centrifugirane. U svaku jažicu pločice nanoseno je 20  $\mu$ L reakcijske smjese. Pločica je kratko centrifugirana na 290g i stavljena u uređaj 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Uvjeti umnažanja bili su: 50°C/2 min; 95°C/2 min; 40 ciklusa: 95°C/15 sekundi ;60°C/15 sekundi; 72°C/1 min).

Analiza podataka napravljena je korištenjem komparativne metode  $\Delta\Delta C_t$ , koja se temelji na analizi brojčane vrijednosti  $C_t$  (od engl. Cycle Threshold) koja označava dio ciklusa u kojem se fluorescencija DNA-vezujuće boje (u ovom slučaju SYBR Green) može sa sigurnošću detektirati. Vrijednost primarno ovisi o početnoj koncentraciji cDNA u uzorku (ako je u uzorku veća količina cDNA, vrijednost  $C_t$  je niža i obrnuto) (48). Primijenjena je relativna kvantifikacija kojom se pratila promjena ispoljavanja ciljnog gena (*PHGDH*) u uvjetima UR2 i UR3 u odnosu na kontrolni uvjet UR1, u odnosu na ispoljenost ranije navedenih gena „kućepazitelja“ („housekeepers“), koji su bili endogene kontrole.

Zbog varijacija koje postoje u ispoljavanju gena između uzoraka rađena je normalizacija s endogenim kontrolama („kućepazitelji“, engl. housekeeping genes)  *$\beta$ -aktin*, *GAPDH* i *B2M* čije se ispoljavanje ne mijenja, ili se ne bi trebalo mijenjati, u odnosu na promjenu uvjeta rasta stanica (49). Vrijednost  $\Delta\Delta C_t$  se izračunala prema slijedećim formulama:

a)  $\Delta C_t = C_t$  (ciljni gen) –  $C_t$  (endogena kontrola) ;

b)  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$  (uzorak iz eksperimentalnih uvjeta) –  $\Delta C_t$  (uzorak iz kontrolnog uvjeta) ;

c)  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  = razina promjene ispoljenosti ciljnog gena (50).

### **3.4. Analize na razini proteina**

#### *3.4.1. Izdvajanje ukupnih proteina*

Kemikalije i uzorci su tijekom cijelog procesa izdvajanja bili na ledu. Nakon uklanjanja medija, stanice su dva puta isprane s PBS. U bočice UR1 i UR2 dodano je 300  $\mu$ L, a u bočice UR3 dodano je 280  $\mu$ L kompletiranog pufera RIPA (10 mL RIPA + jedna tableta inhibitora proteaza Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche Applied Science)). Nakon pet minuta inkubacije na ledu, stanice su odvojene od površine bočice strugalicama Cell Scraper (Falcon) i prebačene u mikroepruvete volumena 1,5 mL koje su zatim centrifugirane 14000g/+4°C/15 min. U supernatantu su se nalazili ukupni proteini, koji su prebačeni u nove mikroepruvete i pohranjeni na -80°C.

#### *3.4.2. Izdvajanje proteina jezgre i citoplazme*

Iz bočica u kojima su stanice rasle uklonjen je medij, stanice su ispirane puferom PBS i u bočice je dodano 2,5 mL tripsina. Stanice su se nakon nekoliko minuta inkubacije na sobnoj temperaturi odvojile od podloge. Prebačene su u kompletirani medij pripremljen u epruvetama Falcon volumena 15 mL, te centrifugirane 250g/4°C/5 minuta. Supernatant je uklonjen, a talog resuspendiran u 1 mL pufera PBS te prebačen u mikroepruvete od 1,5 mL i centrifugiran na 500g/+4°C/5 minuta. Supernatant je uklonjen, a talog još jednom resuspendiran u 1 mL pufera PBS i centrifugiran 500g/+4°C/3 minute. Nakon uklanjanja supernatanta započeto je odvojeno („frakcionirano“) izdvajanje proteina korištenjem komercijalno dostupnog kompleta kemikalija NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific Fisher) s dodatkom inhibitora proteaza, prema uputama proizvođača.

Proteini citoplazme: Na talog stanica dodana je kemikalija CER I; uzorak je vorteksiran 15 sekundi te inkubiran na ledu 10 minuta, nakon čega je dodana kemikalija CER II. Uzorak je vorteksiran 5 sekundi, inkubiran na ledu 1 minutu, ponovno vorteksiran 5 sekundi i centrifugiran, 16000g/+4°C/5minuta. Proteini citoplazme u supernatantu su prebačeni u nove mikroeprovete i pohranjeni na -80°C.

Proteini jezgre: Preostali talog je ispran kemikalijom CER I i centrifugiran 16000g/+4°C/5minuta. Nakon što je uklonjen supernatant, na talog je stavljena kemikalija CER I. Uzorci su vorteksirani 15 sekundi i inkubirani na ledu 10 minuta, što je ponovljeno četiri puta. Posljednjim centrifugiranjem, 16000g/+4°C /10 minuta, dobiveni su proteini jezgre koji su prebačeni u nove mikroeprovete i pohranjeni na -80°C.

#### *3.4.3. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu*

Za određivanje koncentracije proteina korištena je metoda po Bradfordu koja se temelji na vezanju boje Coomassie brilliant blue G-250 na pozitivno nabijene aminokiseline (arginin, lizin i histidin) i aromatske aminokiseline (tirozin, triptofan i fenilalanin) što rezultira promjenom boje koja je detektirana pri valnoj duljini 595 nm (51). Prije početka izvođenja metode, pripremljeno je razrijeđenje 5X Bradford Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad) s mQ vodom (5 mL + 20 mL), kako bi se dobilo razrijeđenje 1X Bradford. Otopina je profiltrirana. Napravljena su i razrjeđenja albumina iz seruma goveda (BSA, od engl. Bovine Serum Albumin) (Cell Signaling Technology) za izradu standardne krivulje. Za mjerenje koncentracije proteina jezgre i citoplazme, BSA je otopljen u puferu PBS, a za mjerenje ukupnih proteina u kompletiranom puferu RIPA. Pripremljena je temeljna standardna otopina koncentracije 10 mg/mL, iz koje su napravljena razrjeđenja: 0; 0,03; 0,06; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75 te 1 mg/mL, u

mikroeprevetama volumena 1,5 mL. Prije izvođenja metode proteini citoplazme razrijeđeni su 20 puta, a proteini jezgre četiri puta, kako bi izmjerene vrijednosti bile unutar intervala vrijednosti standardne krivulje. Uzorci su prije nanošenja na pločicu bili vorteksirani. U svaku je jažicu nanoseno 5  $\mu$ L uzorka, odnosno standarda BSA, te 200  $\mu$ L reagensa Bradford, nakon čega je pločica inkubirana 5 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbancija je mjerena na valnoj duljini 595 nm, uređajem Multiscan EX (Thermo Scientific), a na temelju usporedbe apsorbancije uzoraka proteina s apsorbancijom razrijeđenja BSA poznatih koncentracija, kvantitativno je određena koncentracija proteina u uzorcima.

#### *3.4.4. Analiza metodom Western blot*

Ova metoda omogućuje identifikaciju i određivanje prisutnosti pojedinačnih proteina u smjesi proteina, s velikom osjetljivošću. Metoda se temelji na stvaranju i detekciji kompleksa antigena i protutijela.

Prvi korak ove metode je elektroforeza u gelu poliakrilamida (PAGE, od engl. Polyacrilamide Gel Electrophoresis), u prisustvu natrij dodecil sulfata (SDS-PAGE), u kojoj se razdvajanje proteina temelji samo na njihovoj veličini. Korištena su dva tipa gela; gel za sabijanje (5%), koji omogućava da proteini istovremeno započnu proces razdvajanja i gel za razdvajanje (10%) Sastojci gelova s pripadajućim volumenima navedeni su u tablici 7. Elektroforeza je napravljena korištenjem aparature Standard TV100 (Scie-plas Ltd.), a odvijala se u 1X puferu (engl. Running Buffer ; 25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1% SDS).

**Tablica 7:** Volumeni kemikalija i pufera potrebni za izradu gela za razdvajanje i gela za sabijanje.

Sastav gelova	Gel za razdvajanje (10%)	Gel za sabijanje (5%)
mQ voda	2,5 mL	2,2 mL
Pufer 1 1,5M Tris-HCl, 0,4% SDS, pH 8,8	1,5 mL	
Pufer 2 0,5M Tris- HCl, 0,4% SDS, pH 6,8		0,9 mL
Akrilamid 30% akrilamid: bis-akrilamid 29:1	2 mL	0,6 mL
10% amonijev persulfat (APS)	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
Tetrametiletilendiamin (TEMED)	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L

U gel je nanoseno 20  $\mu$ l denaturiranog uzorka (10  $\mu$ g proteina + 5x pufer za nanošenje (engl. Laemmli Loading Buffer): 6,25mM Tris-HCl, 50% glicerol, 0,01% bromfenolno modribo boja, 40mM DTT, 1% SDS) + PBS, do 20  $\mu$ l. Nanesen je i standard proteina (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa; Thermo Fisher Scientific). Elektroforeza je trajala 120 minuta na 90 V.

Nakon završetka elektroforeze gel je kratko stavljen u 1x pufer za prijenos (engl. Transfer Buffer ; 25 mM Tris, 192 mM glicin, 20% v/v metanol), nakon čega je složen sustav za prijenos proteina na membranu: a) filter papiri natopljeni puferom za prijenos - nitrocelulozna membrana- gel- filter papiri natopljeni puferom za prijenos, ili b) komercijalno dostupan sustav Trans-Blot Turbo Mini 0.2  $\mu$ m Nitrocellulose Transfer Packs (Bio-Rad). Prijenos je napravljen korištenjem Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad) i trajao je devet minuta pri uvjetima 1,3 A i 25 V. Nakon prijenosa, membrana s proteinima se kratko inkubirala na električnoj miješalici, u otopini Ponceau S (Sigma Aldrich) koja reverzibilno boji proteine, a potom je isprana

destiliranom vodom i skenirana kako bi se koristila u normalizaciji rezultata relativne kvantifikacije ispoljenosti proteina.

Membrana je inkubirana sat vremena u reagensu za blokiranje (engl. Blocking Buffer: 5% nemasno mlijeko u prahu (Cell Signaling Technology) otopljenom u puferu TRIS + 0,1% (v/v) Tween 20 (TBST)). Potom je tri puta po pet minuta isprana u puferu TBST (50mM Tris, pH = 7,6 ; 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20).

Napravljena su razrjeđenja primarnih monoklonalnih protutijela kunića (Cell Signaling Technology, CST) za: anti-PHGDH (1:1000; CST:#66350), anti- $\beta$ -aktin (1:1500; CST:#8457) i anti-TATA-Box Binding Protein (TBP) (1:2000; CST:#44059).  $\beta$ -aktin i TBP su stabilno ispoljeni proteini koji su se koriste kao kontrola nanošenja uzoraka. Membrane su inkubirane u primarnim protutijelima preko noći na temperaturi +4°C, uz lagano miješanje, nakon čega su isprane puferom TBST, tri puta po pet minuta. Nakon trećeg ispiranja, membrane su inkubirane sa sekundarnim protutijelom obilježenim peroksidazom iz hrena (Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody; CST#7074, 1:2000), jedan sat na sobnoj temperaturi. Zatim su tri puta po pet minuta isprane puferom TBST.

Zadnji korak u analizi Western blot bila je detekcija signala kemiluminiscencijom. Za vizualizaciju nastalih imunoloških kompleksa upotrijebljen je komercijalno dostupan SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) i uređaj Alliance Q9 mini (Uvitec). Razina ispoljenosti proteina kvantificirana je pomoću programa ImageJ i Nine Alliance analysis software.

### **3.5. Statistička obrada podataka**

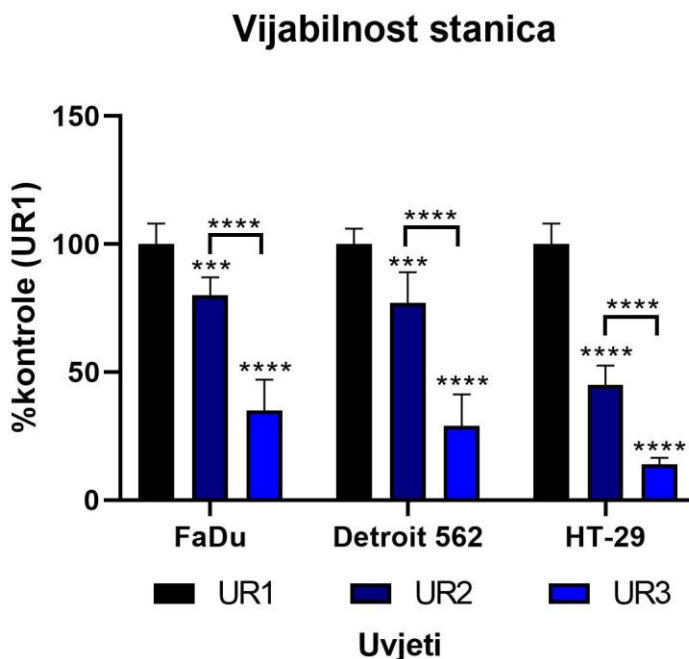
Svaki eksperiment proveden je u tehničkom triplikatu i biološkom duplikatu (stanice uzgojene iz dvije uzastopne pasaže). Za sve statističke analize

korišten je program GraphPad 8.0.0. (GraphPad Software). Podatci su analizirani jednosmjernom analizom varijance (one-way ANOVA) s Tukey post-hoc testom. Vrijednost  $p < 0,05$  određena je kao granica statističke značajnosti.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Određivanje vijabilnosti stanica

Postoji statistički značajna razlika u vijabilnosti stanica koje su rasle u uvjetima gladovanja u odnosu na kontrolu, u sve tri linije stanica (slika 6).



**Slika 6: Vijabilnost zloćudno promijenjenih stanica u kulturi, određena testom MTT, smanjuje se u gladovanju.** Test MTT temelji se na mjerenju metaboličke aktivnosti stanica. Kvantitativni podatci analizirani su korištenjem One-way ANOVA s Tukey post-hoc testom:  $N = 3$ . \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

### 4.2. Kvantificiranje ukupne RNA i proteina

#### 4.2.1 Kvantificiranje i provjera kvalitete ukupne RNA

Uzorcima ukupne RNA, određene su koncentracija i čistoća, omjerom apsorbancije uzorka pri valnoj duljini 260 nm, pri kojoj apsorbiraju molekule DNA, RNA i proteini, te apsorbancije uzorka pri valnoj duljini 280 nm, odnosno 230 nm (tablica 8). Koncentracija RNA u uzorku određena je



spektrofotometrijski, kako bi se napravila odgovarajuća razrjeđenja, odnosno izjednačile koncentracije RNA u svim uzorcima. Optimalne vrijednosti OD 260/280 i OD 260/230 trebale bi biti 2,00, odnosno 2,20. Ako su vrijednosti niže, u uzorku postoji zagađenje molekulama koje apsorbiraju zrake svjetlosti valne duljinu 280 nm i 230 nm (tiocijanati). Čistoća i količina dobivene RNA bila je zadovoljavajuća (tablica 8).

**Tablica 8:** Koncentracija i ukupna količina RNA u uzorcima određena metodom spektrofotometrije.

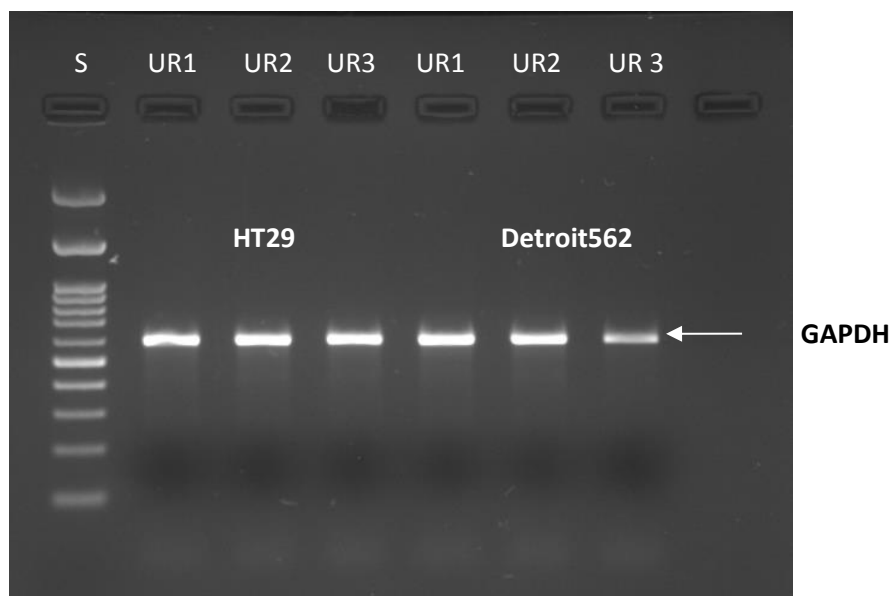
Uvjeti rasta	Koncentracija RNA (ng/μL)	Ukupna količina RNA (μg)	OD 260/280	OD 260/230
HT-29 UR1	729,11	40,101	2,00	2,30
HT-29 UR2	728,89	25,511	1,99	2,29
HT-29 UR3	564,775	19,767	1,97	2,30
Detroit562 UR1	719,36	43,162	2,00	2,18
Detroit562 UR2	548,585	27,429	2,02	2,21
Detroit562 UR3	231,085	11,554	1,94	2,18
FaDu UR1	760,22	68,420	2,02	2,26
FaDu UR2	660,23	52,818	2,01	2,24
FaDu UR3	606,245	42,427	2,02	2,27

Integritet RNA provjeren je elektroforezom u 1% gelu agaroze (slika 7) i umnažanjem cDNA *GAPDH* (slika 8), očekivane veličine 600 pb (slika 5A).



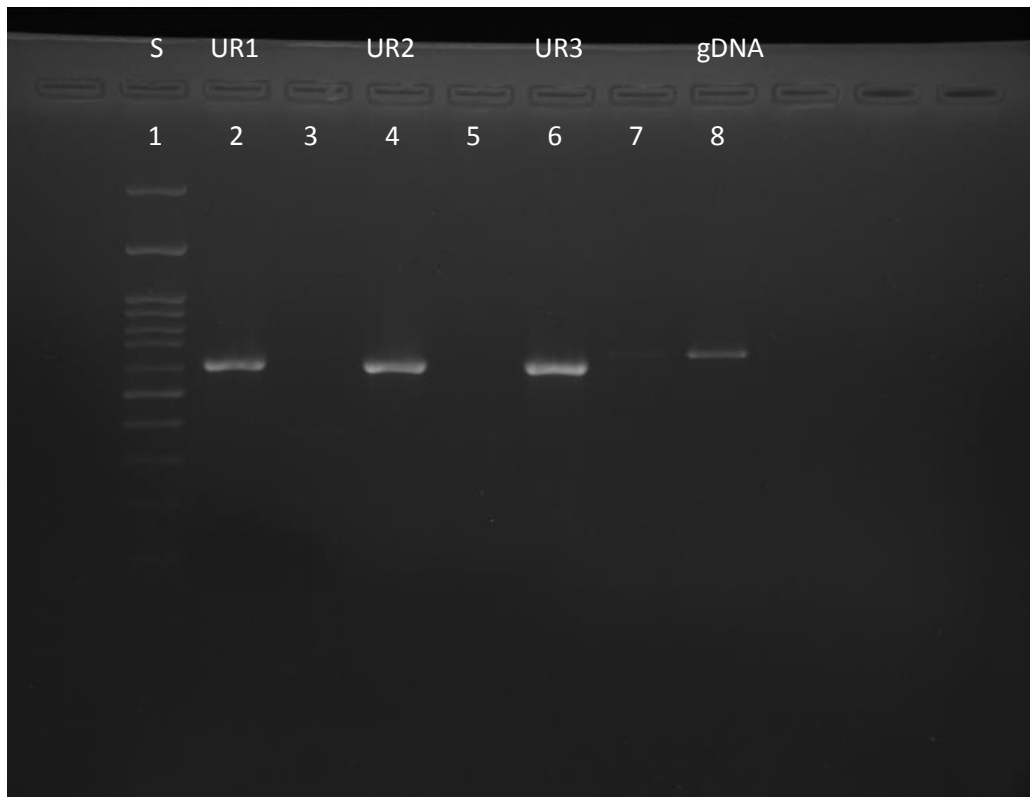
**Slika 7: Ukupna RNA izdvojena iz linija stanica HT29 i Detroit562, u 1% gelu agaroze, u koji je dodan etidij-bromid.** Ukupna količina RNA nanasene na gel: 500 ng. Gornja vrpca: 28S, donja vrpca: 18S. Linije stanica HT29 i Detroit562, nakon 48 sati rasta u uvjetima UR1-UR3. Standard DNA : Lambda/*Hind* III. Strelica: kontaminirajuća gDNA.

Svi su uzorci pročišćeni od eventualno zaostale genomske DNA. Učinkovitost obrnutog prepisivanja provjerena je umnažanjem odsječka gena *GAPDH* lančanom reakcijom polimeraze i elektroforezom u gelu agaroze (slika 8). U svim uzorcima vidljiv je 600 pb dugačak odsječak *GAPDH*, što znači da je obrnuto prepisivanje bilo uspješno.



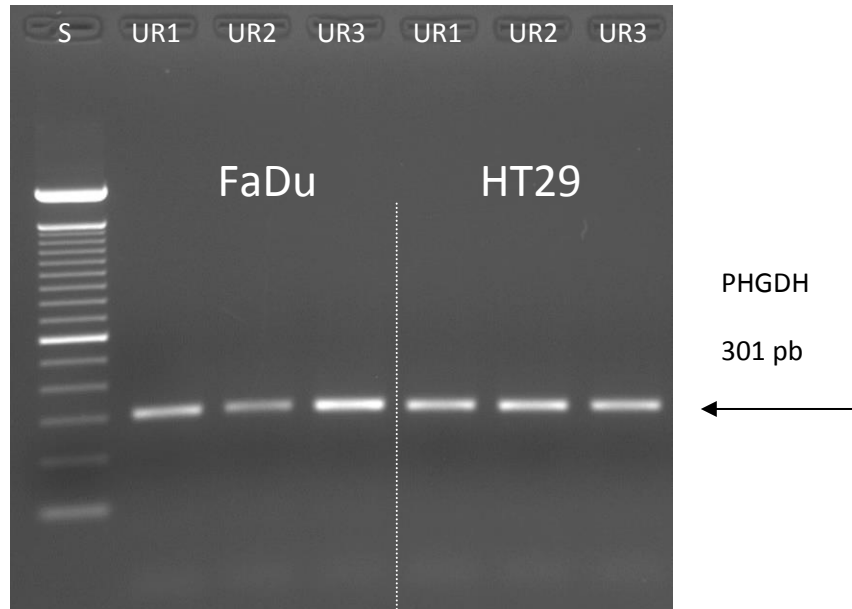
**Slika 8: Provjera kvalitete cDNA umnažanjem odsječka GAPDH u 1% gelu agaroze, u koji je dodan etidij-bromid.** Linije stanica HT29 i Detroit562, nakon 48 sati rasta u uvjetima UR1-UR3. Standard DNA FastGene 100 bp DNA ladder RTU. Strelica: GAPDH, 600 pb.

Dodatno je cDNA dobivena obrnutim prepisivanjem, korištena i za umnažanje početnicama GAPDH1/GAPDH2 i GAPDH2/GAPDH3, pod istim uvjetima, i u isto vrijeme. Pozitivna kontrola bila je genomska DNA (slika 9, linija 8). Uzorci UR1 i UR2 ne sadrže genomsku DNA (slika 9, linije 3 i 5), a u UR3 je prisutno minimalno zagađenje genomskom DNA (slika 9, linija 7).



**Slika 9: Provjera zagađenja cDNA genomsom DNA nakon pročišćavanja RNA, lančanom reakcijom polimeraze i elektroforeze u 1% gelu agaroze, u koji je dodan etidij bromid.** 1: Standard DNA FastGene 100 bp DNA ladder RTU. 2,4,6: FaDu cDNA umnožena početnicama GAPDH1/GAPDH2. 3,5,7: FaDu cDNA umnožena početnicama GAPDH2/GAPDH3. 8: gDNA HT29 umnožena GAPDH2/GAPDH3 početnicama (pozitivna kontrola).

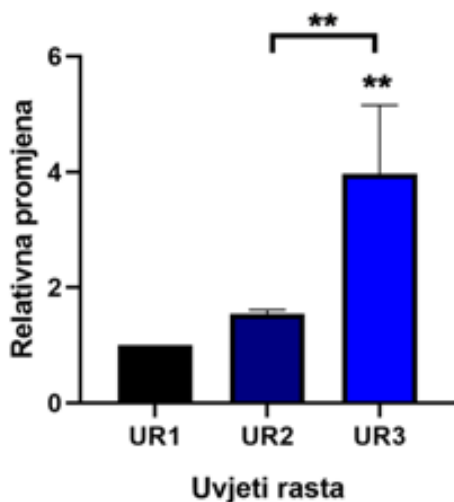
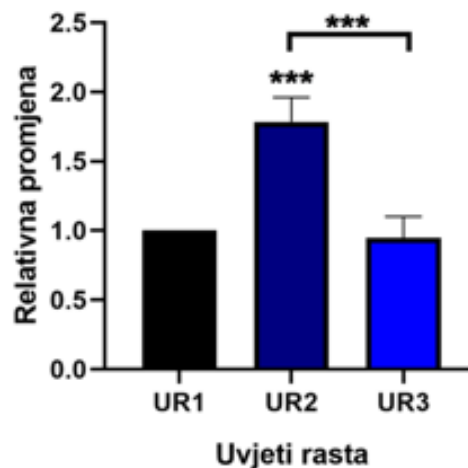
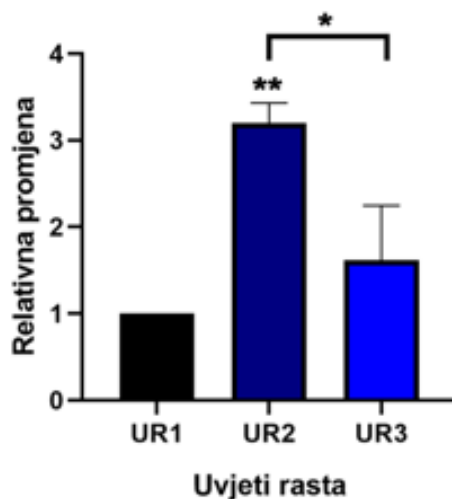
Nakon svih provedenih provjera, a prije kvantificiranja ciljnog transkripta, provjerena je ispoljenost gena *PHGDH* (slika 10) korištenjem početnica prikazanih u tablici 4. Aktivnost ciljnog gena moguće je kvantificirati s obzirom na to da je ispoljen u obje linije stanica (FaDu i HT29), ali intenzitet ispoljenosti nije jednak u dva uvjeta gladovanja i kontrolnom uvjetu rasta.



**Slika 10: Kvalitativan prikaz ispoljenosti *PHGDH* u stanicama FaDu i HT29, u tri uvjeta rasta, dobiven elektroforezom u 1% gelu agaroze, u koji je dodan etidij-bromid. S: Lambda/*Hind* III.**

#### 4.2.2. Kvantificiranje transkripta *PHGDH* metodom RT-qPCR

Kvantificiranje ciljnog transkripta napravljeno je lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu. Pokazano je da linija stanica FaDu ima drugačiji trend ispoljavanja *PHGDH* u gladovanju, u odnosu na Detroit562 i HT-29 (slika 11).

**A FaDu: RT-qPCR PHGDH****B Detroit 562: RT-qPCR PHGDH****C HT29: RT-qPCR PHGDH**

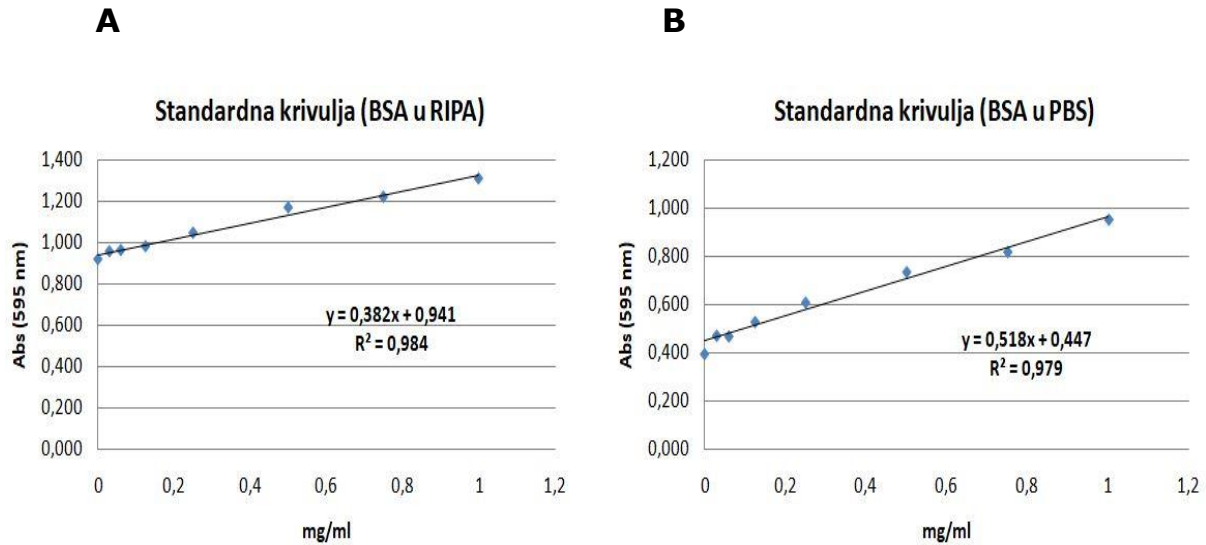
**Slika 11: Ispoljenost ciljnog transkripta PHGDH određena lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu razlikuje se ovisno o uvjetima rasta i o vrsti stanica. A FaDu, B Detroit562 i C HT29.** Korišteni geni kućepazitelji:  $\beta$ -aktin, B2M, GAPDH, HMBS, HPRT (tablica 6). Kvantitativni podatci analizirani su korištenjem One-way ANOVA s Tukey post-hoc testom: N = 3. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001.

Linija stanica FaDu razlikuje od ostale dvije stanične linije u odnosu na trend ispoljavanja PHGDH u gladovanju. U ovoj liniji prisutna je statistički značajna

razlika u porastu ciljnog transkripta između kontrolnog uvjeta UR1 i UR3 ( $p=0,0041$ ) i UR2 i UR3 ( $p=0,0098$ ). U stanicama Detroit562 i HT29, ispoljenost *PHGDH* je slična u uvjetima UR1 i UR3. Statistički značajna razlika postoji između kontrole i UR2 ( $p=0,0009$  za Detroit562;  $p=0,0049$  za HT29) te dva uvjeta gladovanja: UR2 i UR3 ( $p=0,0007$  za Detroit562;  $p=0,0196$  za HT29).

#### *4.2.1 Kvantificiranje proteina*

Koncentracija proteina izmjerena je metodom po Bradfordu. Koncentracije proteina interpolirane su pomoću kalibracijske krivulje prikazane na slici 12.



**Slika 12: Standardna krivulja razrjeđenja BSA korištena za određivanje koncentracije ukupnih proteina (A) i proteina jezgre i citoplazme (B) metodom po Bradfordu.** Koncentracija proteina u uzorcima određena je u odnosu na koncentracije BSA (0; 0,03; 0,06; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75, 1 mg u 1 mL pufera RIPA/PBS), prema kojima su napravljene standardne krivulje.

S obzirom na to da je PHGDH primarno protein citoplazme, zanimao nas je i omjer proteina u citoplazmi i jezgri.

U tablici 9 vidljivo je da korištenje ranije opisanog protokola dovodi do postotka omjera proteina citoplazme i proteina jezgre, od približno 90-95:10-5%.



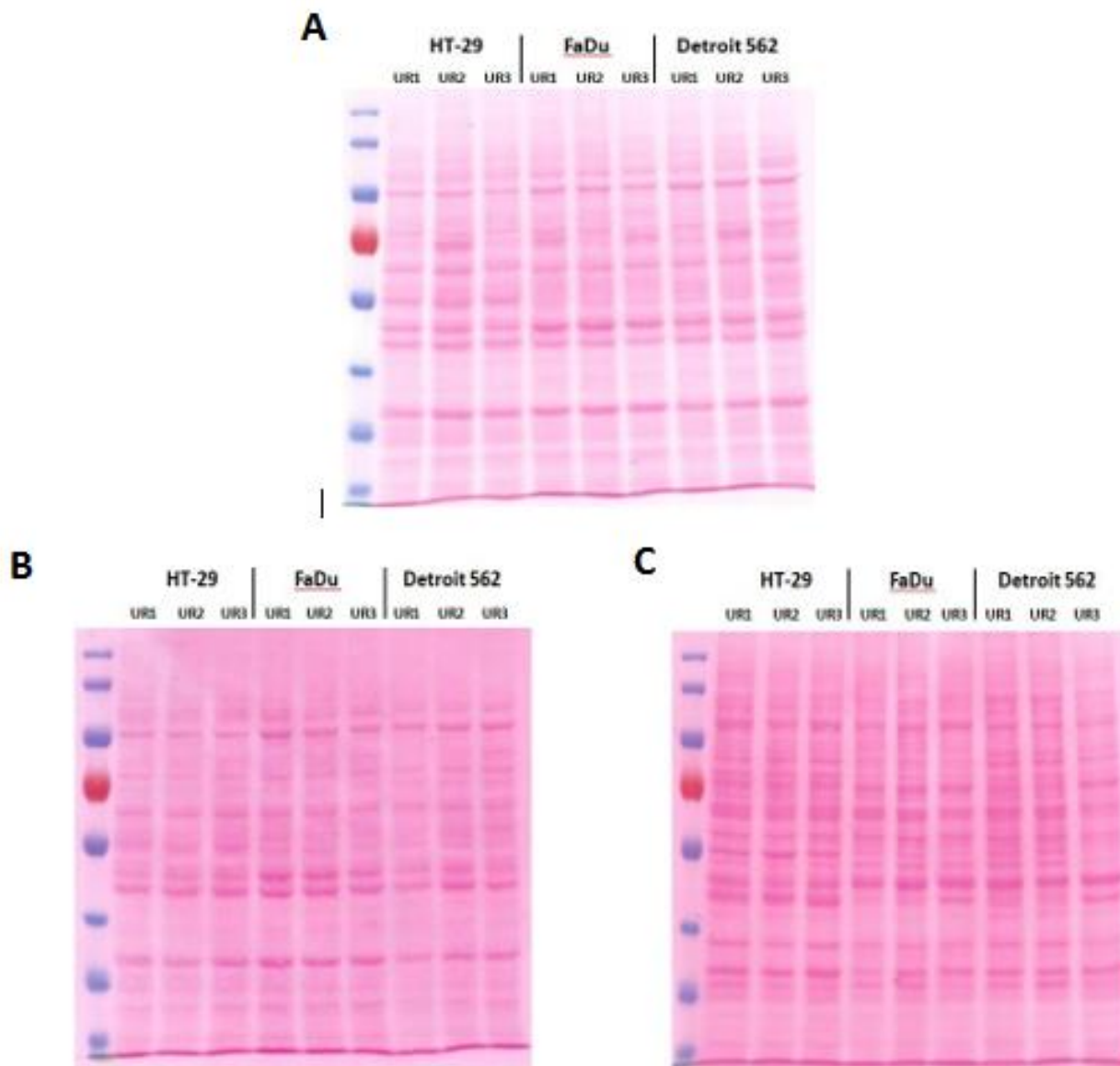
**Tablica 9:** Omjer proteina citoplazme i proteina jezgre u tri linije stanica, nakon frakcioniranog izdvajanja.

FaDu					
		Volumen	Koncentracija (µg/µl)	Ukupna količina proteina (µg)	%
UR1	citoplazma	150	17,30	2595	93,5
	jezgra	75	2,4	180	6,5
UR2	citoplazma	150	15,4	2310	93,6
	jezgra	75	2,1	157.5	6,4
UR3	citoplazma	50	6,3	315	94
	jezgra	25	0,8	20	6
Detroit562					
UR1	citoplazma	100	14,2	1420	92,5
	jezgra	50	2,3	115	7,5
UR2	citoplazma	100	13,9	1390	93
	jezgra	50	2,1	105	7
UR3	citoplazma	50	5,8	290	90
	jezgra	25	1,3	32.5	10
HT29					
UR1	citoplazma	150	13,2	1980	91,3
	jezgra	75	2,5	187.5	8,7
UR2	citoplazma	150	9	1350	91,4
	jezgra	75	1,7	127.5	8,6
UR3	citoplazma	50	7,3	365	89,6
	jezgra	25	1,7	42.5	10,4

### 4.3. Western blot

#### 4.3.1 Elektroforeza i prijenos proteina na membranu

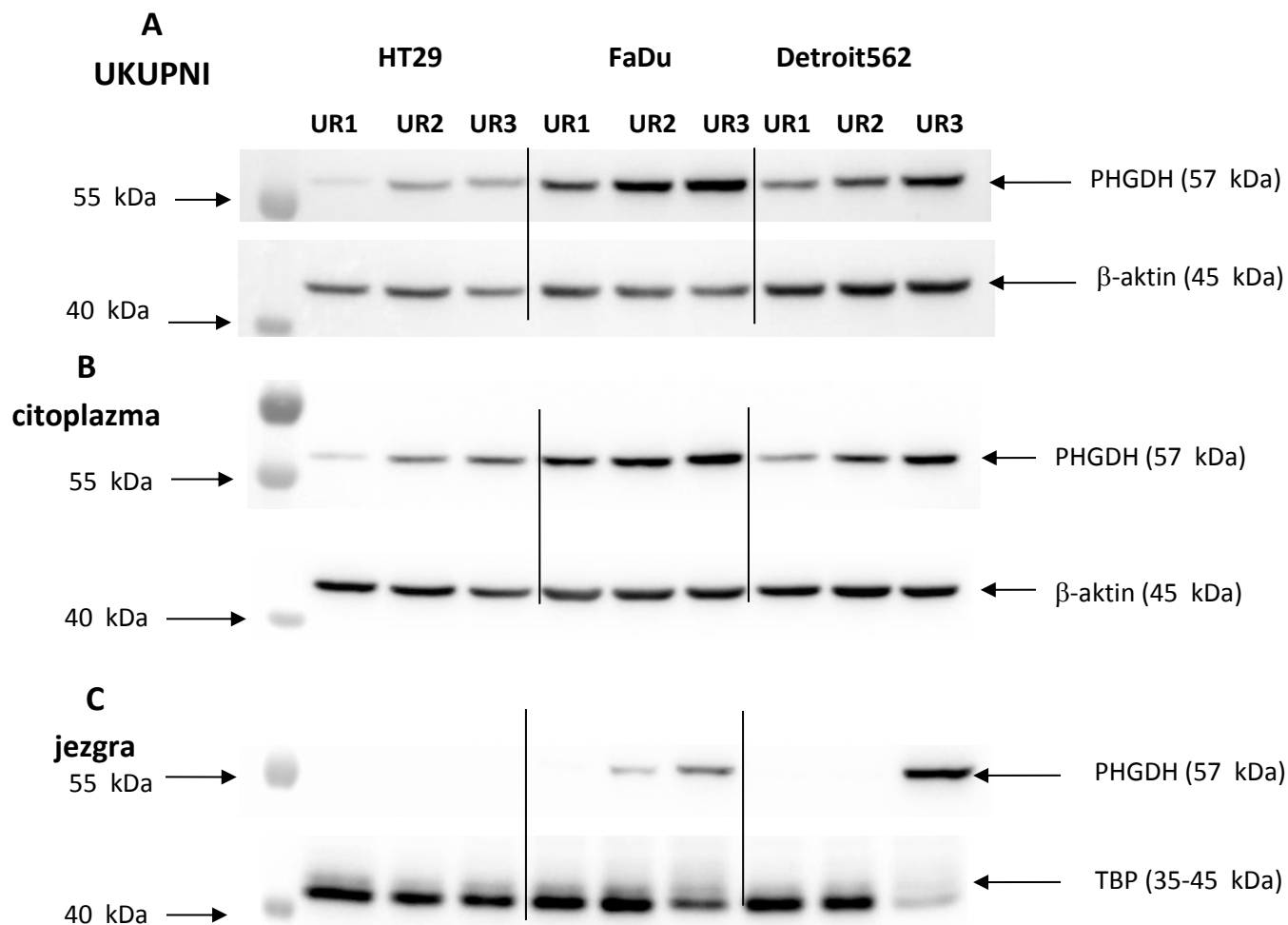
Iz stanica su izdvojeni ukupni proteini, te proteini jezgre i citoplazme. Nakon završene elektroforeze i prijenosa na membranu, učinkovitost prijenosa provjerena je bojanjem membrane bojom Ponceau S (slika 13).



**Slika 13: Uspješan prijenos ukupnih proteina (A), proteina citoplazme (B) i proteina jezgre (C) na membranu.** Membrana je nakon prijenosa proteina reverzibilno obojana otopinom Ponceau S, isprana destiliranom vodom i skenirana kako bi se napravila denzitometrija odabranih vrpca. Ovi kvantitativni podatci korišteni su za normalizaciju prilikom izračuna koji se koristio za određivanje relativne ispoljenosti proteina PHGDH.

#### *4.3.2. Izraženost proteina PHGDH*

Nakon inkubiranja imobiliziranih proteina s monoklonskim protutijelom, dobiveni su signali prikazani na slici 14. Vidljivo je da se signal PHGDH pojačava s gladovanjem u ukupnom lizatu i citoplazmi sve tri linije stanica. U jezgri HT29 ne postoji signal PHGDH, a u jezgri FaDu i Detroit562 pojačava se u gladovanju i najizraženiji je u UR3.



**Slika 14: Signal PHGDH pokazan metodom Western blot mijenja se u gladovanju, u sve tri linije stanica.** Signal je detektiran kemiluminiscencijom. Proteini kućepazitelj  $\beta$ -aktin i TBP korišteni su za normalizaciju prilikom izračuna koji se koristio za određivanje relativne ispoljenosti proteina PHGDH.

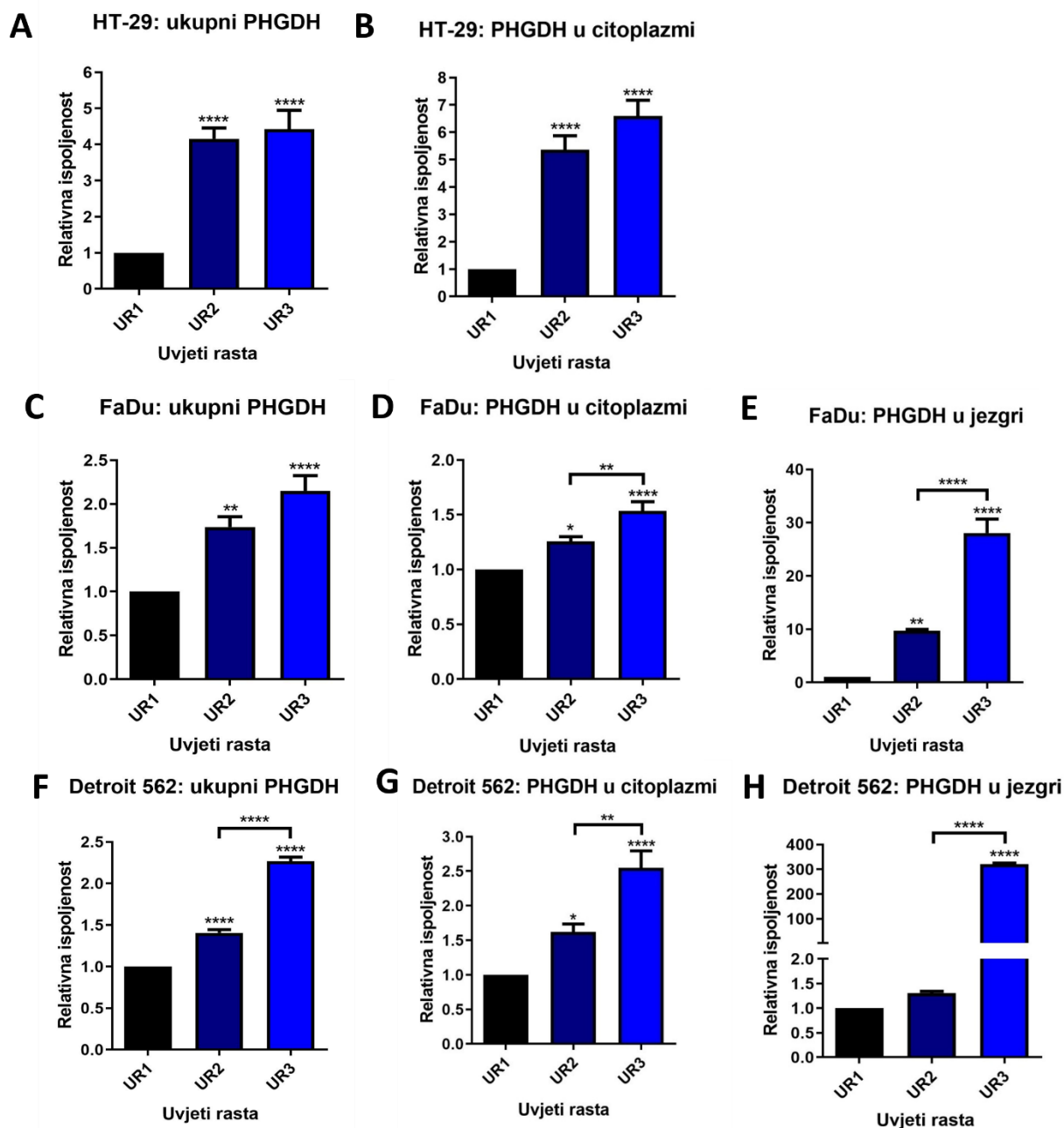
#### 4.3.3. Kvantifikacija proteina

Jačina signala određena je denzitometrijom i normalizirana u odnosu na ukupne proteine i/ili protein kućepazitelj. Dobiveni podatci su analizirani programom GraphPad8.0.0. (GraphPad Software) te prikazani na slici 15.

U sve tri linije stanica trend porasta ispoljavanja PHGDH vidljiv je u ukupnom lizatu i citoplazmi. Istovjetan, uzlazni trend postoji u jezgrama stanicama FaDu i Detroit562. Za razliku od ove dvije linije stanica, signal PHGDH u jezgrama stanica HT29 nije bio prisutan, neovisno o uvjetima rasta. Dodatno, u liniji HT29 već je u uvjetu UR2 došlo do značajnog povećanja ukupnog PHGDH (približno 5 puta;  $p < 0,0001$ ), koji je odraz povećanja količine proteina u citoplazmi. U uvjetu UR3, u kojem je ispoljenost PHGDH najizraženija, stanice imaju sličnu, približno pet puta povišenu razinu PHGDH u frakciji ukupnih proteina, u odnosu na kontrolni uzorak, kao posljedicu porasta PHGDH u citoplazmi (slike 15A, 15B).

Uz prisustvo glutamina, ali uz smanjenu koncentraciju glukoze (UR2), u stanicama FaDu se ukupna količina PHGDH značajno povećava (približno 1,8 puta;  $p = 0,0026$ ), pri čemu je povećanje u jezgri (približno 10 puta;  $p = 0,0045$ ) znatno snažnije od onoga u citoplazmi (slike 15D, 15E). U uvjetu UR3 dolazi do još snažnijeg porasta ukupnog PHGDH (približno 2,2 puta;  $p < 0,0001$ ), pri čemu je porast u citoplazmi slabiji (1,5 puta;  $p < 0,0001$ ) u odnosu na porast signala u jezgri (približno 29 puta;  $p < 0,0001$ ). Za razliku od stanica HT29, koje u uvjetu UR3 nemaju signal u jezgri, u liniji Detroit562 je iznimno snažan (približno 300 puta;  $p < 0,0001$ ), samo u ovom uvjetu. Vidljivo je da smanjena količina glukoze u mediju dovodi do umjerenog porasta PHGDH u citoplazmi (2,5 puta u odnosu na kontrolu;  $p = 0,0409$ ), dok je u jezgri nepromijenjen. U ukupnom lizatu stanica Detroit562 postoji statistički značajna razlika u porastu PHGDH, u uvjetima UR2 i UR3, u odnosu na UR1;  $p < 0,0001$ .

Razvidno je da signal PHGDH u citoplazmi „prati“ trend ispoljenosti proteina u ukupnom lizatu, i u FaDu, i u Detroit562;  $UR1 < UR2 < UR3$ . Iz svega prikazanog, a naročito na temelju signala PHGDH u jezgri, razvidno je da se u uvjetima zadanog gladovanja, stanice podrijetlom od karcinoma kolona ponašaju drugačije od stanica podrijetlom od tumora glave i vrata.



**Slika 15: Ispoljenost proteina PHGDH u ukupnom lizatu, citoplazmi i jezgri linija stanica HT29, FaDu i Detroit562 povećana je u gladovanju.** Prikazana je ispoljenost PHGDH u **A** ukupnom lizatu HT29, **B** citoplazmi HT29, **C** ukupnom lizatu FaDu, **D** citoplazmi FaDu, **E** jezgri FaDu, **F** ukupnom lizatu Detroit562, **G** citoplazmi Detroit562, **H** jezgri Detroit562. Kvantificiranje korištenjem ImageJ i Nine Alliance analysis software i normalizacija u odnosu na ukupne proteine i protein kućepazitelje. Kvantitativni podatci

analizirani su jednosmjernom analizom varijance (one-way ANOVA) s Tukey post-hoc testom.  
N = 3. \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001; \*\*\*\* p <0,0001.

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Test MTT i njegova interpretacija

Iako uvriježeno, određivanje vijabilnosti stanica testom MTT ima velikih nedostataka, na što upućuje novija literatura. Test se temelji na promjeni optičke gustoće medija, koja ovisi o metaboliziranju tetrazolijevih soli. Osim promjene vijabilnosti zloćudne stanice, promjena se može dogoditi i zbog drugih razloga: prolazne inhibicije rasta, koja je posljedica uključivanja nove razine kontrole ciklusa stanice, pojave mirovanja („dormancy“), kroz senescenciju ili multinukleaciju, te reverzibilnu apoptozu („anastasis“) i reverzibilni gubitak integriteta stanične membrane (52, 53). Neovisno o tome kojim se mehanizmom metabolizam MTT mijenjao, razvidno je da postoji razlika između analiziranih linija. Podatci vezani uz gladovanje za linije stanica FaDu i Detroit562 (tumori glave i vrata) objavljeni su 2019. godine (54). U ovom su istraživanju ponovljeni, a dodatno su dobiveni i podatci za liniju karcinoma debelog crijeva, HT29. Sve tri linije stanica osjetljive su na zadane uvjete gladovanja.

### 5.2. Gladovanje i promjena ispoljavanja PHGDH na razini transkripta i proteina

#### 5.2.1. Promjena transkripcijske aktivnosti

U uvjetima rasta s visokom koncentracijom glukoze (kontrolni uvjet rasta, UR1), *PHGDH* je transkripcijski aktivan (slika 10). Nutricijski stres, naročito nedostatak glukoze i glutamina, značajno se odrazio na razinu transkripcije *PHGDH*. Osim ciljnog gena, zbog nutricijskog stresa, narušena je razina transkripcije gena kućepazitelja, koja se uvriježeno smatra stabilnom. Iako je najveći broj umnažanja bio napravljen s početnicama za *GAPDH*, u nekim su



slučajevima u reakcijama umnažanja korišteni i drugi „housekeeperi“, prema slijedećem pravilu: ako u zadanom uvjetu dođe do pomaka vrijednost Ct „housekeepera“ za više od 0,3 ciklusa, dobiveni se podatak ne smatra važećim. S obzirom na to da se ovaj problem javlja u odnosu na vrstu stanice, može se sa sigurnošću zaključiti da univerzalnog „housekeepera“ nema. U ovom je radu kvantificirana promjena razine ispoljenosti *PHGDH* korištenjem početnica za; HT29: *GAPDH*, *HPRT1* (od engl. Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase, *B2M* (od engl. Beta-2-Microglobulin); FaDu: *GAPDH* i *HPRT1*; Detroit562: *GAPDH*, *HMBS* (od engl. Hydroxymethylbilane Synthase), *ACTB* (Actin Beta) (54, 55). Posljedica izostanka stabilnog ispoljavanja "housekeepera" najbolje je vidljiva na relativno velikim standardnim devijacijama koje se pojavljuju u uvjetima UR3, a nema ih u uvjetu UR2 (slika 11).

Na slici 11 vidljivo je i da se ispoljenost *PHGDH* razlikuje ovisno o raspoloživosti glukoze (UR2)/glukoze i glutamina (UR3), na način koji je specifičan za pojedinu liniju stanica. Biološki značaj promjena *PHGDH* pokazanih u ovom radu nastavit će se istraživati, s obzirom na to da u literaturi ne postoje podatci s kojima bismo usporedili dobivene rezultate, a podatci o načinu reguliranja promotora *PHGDH* su vrlo oskudni (56). Neovisno o tome, stanično specifičan odgovor na stresni događaj pokazan je u mnogim istraživanjima koja se temelje na djelovanju različitih spojeva, uključujući kurkumin i njegovo otapalo etanol (57) te lijekove (58).

Ispoljenost *PHGDH* u stanicama HT29 povećava se u odnosu na kontrolu u uvjetima blagog nutritivnog stresa (UR2), a smanjuje se ili je slična kao u kontroli u uvjetima snažnog nutritivnog stresa (UR3).

O razlozima pokazanih promjena transkripcijske aktivnosti moći će se raspravljati tek nakon mjerenja specifičnih metabolita i analize promotora *PHGDH* metodom kromatinske imunoprecipitacije.

### 5.2.2 Promjena razine proteina

Na temelju slike 14, razvidno je da linije stanica u kontrolnim uvjetima rasta ne posjeduju jednaku količinu proteina PHGDH (HT29 < Detroit562 < FaDu). Iako je trend ispoljavanja proteina PHGDH istovjetan u sve tri linije stanica – pojačava se u gladovanju, unutarstanični smještaj proteina je značajno različit. Razvidno je i da količina proteina odgovara količini mRNA s obzirom na to da se signal Ct u FaDu i Detroit562 pojavljuje između 22. i 23. ciklusa, dok se u HT29 pojavljuje između 25. i 26. ciklusa, u reakcijama kvantifikacije u stvarnom vremenu. Na linijama stanica podrijetlom od glioblastoma i karcinoma dojke (ukupni lizati), pokazano je da količina PHGDH u uvjetima rasta s visokom glukozom (UR1) može znatno varirati (41). Dodatno je pokazano i da je povećana količina proteina posljedica amplifikacije lokusa na kojem se nalazi gen *PHGDH*. (59). Ne postoje podatci koji bi upućivali da FaDu i Detroit562 posjeduju amplifikaciju lokusa 1p12. Postojanje razlike u početnoj razini proteina nije posljedica nepreciznog nanošenja uzoraka u gel, s obzirom na to da je količina proteina prenesenih na membranu, neovisno o liniji i uvjetu rasta, uniformna (slika 13). Razvidno je i da se signal korištenog proteina kućepazitelja,  $\beta$ -aktina, mijenja s obzirom na uvjete rasta, naročito u linijama HT29 i FaDu. Zbog toga su denzitometrije, podatci kojih su obrađeni i prikazani na slici 15, napravljene i u odnosu na ukupne proteine prenesene na membranu.

Neovisno o raspoloživoj glukozu i glutaminu, stanice podrijetlom od zloćudnog tumora debelog crijeva, HT29, nemaju PHGDH u jezgri, dok je u dvije linije stanica podrijetlom od zloćudnog tumora ždrijela signal PHGDH u jezgri prisutan. Njegova je količina obrnuto razmjerna dostupnoj glukozu i glutaminu. Ovo je naročito dobro vidljivo u liniji Detroit562. Iz svega prikazanog, a naročito na temelju signala PHGDH u jezgri, razvidno je da se u uvjetima zadanog gladovanja, stanice podrijetlom od karcinoma kolona ponašaju drugačije od stanica podrijetlom od tumora glave i vrata.

Protein PHGDH smatra se primarno citoplazmatskim proteinom. U nativnim je zloćudnim tumorima debelog crijeva, metodom imunohistokemije, signal PHGDH dokazan primarno u citoplazmi u 118 od 193 analizirana tumora (76.1%) i u 38 od 183 pripadajućih peritumorskih tkiva (20.8%) (60). Za sada ne postoje podatci o razini ispoljenosti i razdiobi signala PHGDH u tumorima glave i vrata. Ne postoje niti podatci koji bi nam koristili za pojašnjenje fenomena opaženog u UR3, u stanicama Detroit562 – pojava snažnog signala PHGDH u jezgri. U uvjetu UR3 je ranije pokazan i snažan porast signala za TP53, u jezgrama stanica FaDu, ali ne i stanica Detroit562 (54). Razvidno je će se odgovori vezani uz funkcionalni značaj smještaja PHGDH u jezgri, u gladovanju, tražiti u budućim istraživanjima.

#### **5.4. Odnos transkripta i proteina PHGDH u odnosu na uvjete gladovanja**

Vidljivo je da u uvjetima UR2 postoje istovjetni trendovi na razinama transkripta i proteina. Ovo je izrazito očito u stanicama HT29: snažan porast razine PHGDH mRNA vidljiv je i na razini proteina.

U uvjetima ekstremnog gladovanja, UR3, stanice nisu mogle uzeti glutamin iz medija kako bi ga iskoristile u sintezi proteina. Porast proteina PHGDH je u ovom slučaju bio teško poveziv s rezultatima na razini mRNA (slike 11, 15), koji pokazuju rastući trend ispoljavanja PHGDH u gladovanju samo u slučaju stanica FaDu. Nesrazmjer je najbolje vidljiv u stanicama HT29, u kojima se četverostruki porast razine proteina ne može objasniti porastom transkripcije. Uzrok ovom neslaganju bi moglo biti eventualno stabiliziranje proteina, u uvjetima gladovanja.

Nedavno je otkriveno da se PHGDH razgrađuje u proteasomu, ubikvitinskim putem razgradnje, koji je posredovan ligazom E3 RNF5 (61). Ovaj put razgradnje izostaje ako je PHGDH acetilirana na lizinu K58, posredstvom

SIRT2. Poznato je da su članovi obitelji sirtuina uključeni u metaboličke procese. U skladu s time, u budućim će se istraživanjima provjeriti uloga SIRT2 u potencijalnom stabiliziranju PHGDH, čije je postojanje razvidno u kontekstu niske razine transkripta i visoke razine proteina, u FaDu i HT29.

## 6. ZAKLJUČAK

Ovim istraživanjem pokazano je da su sve tri linije zloćudno promijenjenih stanica osjetljive na zadane uvjete gladovanja. Razlika tri linije zloćudno promijenjenih stanica u odnosu na ispoljenosti (UR1) PHGDH na razini transkripta i na razini proteina postoji. Transkripcijska aktivnost PHGDH mijenja se, ovisno o raspoloživosti glukoze (UR2) i glutamina (UR3), specifično za pojedinu liniju stanica. Ovisno o uvjetima rasta, ispoljenost ciljnog gena i proteina, kao i njegov unutarstanični smještaj, mijenjaju se na način koji je specifičan za pojedinu liniju. Jedina linija stanica u kojoj u oba uvjeta gladovanja dolazi do porasta transkripta i proteina je linija FaDu. U preostale dvije linije trend porasta mRNA praćen porastom razine ukupnih proteina prisutan je samo u uvjetu UR2. U uvjetu UR3, razina proteina je u odnosu na kontrolni uvjet rasta visoka (Detroit562) ili vrlo visoka (HT29). Ove razlike ne postoje na razini transkripta PHGDH. Iako je trend ispoljavanja ciljnog proteina istovjetan u sve tri linije stanica – pojačava se u gladovanju, unutarstanični smještaj proteina je značajno različit. Neovisno o raspoloživoj glukozi i glutaminu, stanice podrijetlom od zloćudnog tumora debelog crijeva, HT29, nemaju PHGDH u jezgri. Ovo je očekivano, s obzirom na to da se PHGDH smatra proteinom citoplazme. Međutim, dvije linije podrijetlom od zloćudnog tumora ždrijela imaju PHGDH u jezgri, a njegova je količina obrnuto razmjerna dostupnoj glukozi i glutaminu. Ovo je naročito dobro vidljivo u liniji Detroit562. Na temelju ovih, preliminarnih, rezultata može se zaključiti da se stanice sličnog podrijetla, u kontekstu metabolizma generalno, i PHGDH specifično, ponašaju na sličan način. Ovim istraživanjem otvorilo se nekoliko pitanja, među kojima je najzanimljivije pitanje vezano uz funkcije PHGDH u jezgri gladovanju izloženih zloćudnih stanica.

## 7. LITERATURA

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
2. Ghosh D, Dawson MR. Microenvironment Influences Cancer Cell Mechanics from Tumor Growth to Metastasis. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1092:69-90.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
4. Erickson A, Hayes A, Rajakumar T, Verrill C, Bryant RJ, Hamdy FC, et al. A Systematic Review of Prostate Cancer Heterogeneity: Understanding the Clonal Ancestry of Multifocal Disease. *Eur Urol Oncol*. 2021;4(3):358-69.
5. Jain RK, Munn LL, Fukumura D. Dissecting tumour pathophysiology using intravital microscopy. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(4):266-76.
6. Gullo I, Grillo F, Mastracci L, Vanoli A, Carneiro F, Saragoni L, et al. Precancerous lesions of the stomach, gastric cancer and hereditary gastric cancer syndromes. *Pathologica*. 2020;112(3):166-85.
7. Takashima A, Faller DV. Targeting the RAS oncogene. *Expert Opin Ther Targets*. 2013;17(5):507-31.
8. Morris LG, Chan TA. Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. *Cancer*. 2015;121(9):1357-68.
9. Knudsen ES, Nambiar R, Rosario SR, Smiraglia DJ, Goodrich DW, Witkiewicz AK. Pan-cancer molecular analysis of the RB tumor suppressor pathway. *Commun Biol*. 2020;3(1):158.
10. Pinto EM, Zambetti GP. What 20 years of research has taught us about the TP53 p.R337H mutation. *Cancer*. 2020;126(21):4678-86.
11. Korkola J, Gray JW. Breast cancer genomes--form and function. *Curr Opin Genet Dev*. 2010;20(1):4-14.

12. Seluanov A, Hine C, Azpurua J, Feigenson M, Bozzella M, Mao Z, et al. Hypersensitivity to contact inhibition provides a clue to cancer resistance of naked mole-rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(46):19352-7.
13. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Cancer metabolism: looking forward. *Nat Rev Cancer*. 2021.
14. Witsch E, Sela M, Yarden Y. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)*. 2010;25(2):85-101.
15. Dyson NJ. RB1: a prototype tumor suppressor and an enigma. *Genes Dev*. 2016;30(13):1492-502.
16. Anderson AR, Weaver AM, Cummings PT, Quaranta V. Tumor morphology and phenotypic evolution driven by selective pressure from the microenvironment. *Cell*. 2006;127(5):905-15.
17. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):401-10.
18. Katayama Y, Uchino J, Chihara Y, Tamiya N, Kaneko Y, Yamada T, et al. Tumor Neovascularization and Developments in Therapeutics. *Cancers (Basel)*. 2019;11(3).
19. Manuelli V, Pecorari C, Filomeni G, Zito E. Regulation of redox signaling in HIF-1-dependent tumor angiogenesis. *Febs j*. 2021.
20. Lees A, Sessler T, McDade S. Dying to Survive-The p53 Paradox. *Cancers (Basel)*. 2021;13(13).
21. Huber V, Camisaschi C, Berzi A, Ferro S, Lugini L, Triulzi T, et al. Cancer acidity: An ultimate frontier of tumor immune escape and a novel target of immunomodulation. *Semin Cancer Biol*. 2017;43:74-89.
22. Terzic J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2101-14.e5.
23. Boroughs LK, DeBerardinis RJ. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nat Cell Biol*. 2015;17(4):351-9.

24. Miao P, Sheng S, Sun X, Liu J, Huang G. Lactate dehydrogenase A in cancer: a promising target for diagnosis and therapy. *IUBMB Life*. 2013;65(11):904-10.
25. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123(3191):309-14.
26. Zhu A, Lee D, Shim H. Metabolic positron emission tomography imaging in cancer detection and therapy response. *Semin Oncol*. 2011;38(1):55-69.
27. Anderson NM, Mucka P, Kern JG, Feng H. The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism. *Protein Cell*. 2018;9(2):216-37.
28. Israelsen WJ, Vander Heiden MG. Pyruvate kinase: Function, regulation and role in cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;43:43-51.
29. Cerella C, Dicato M, Diederich M. Modulatory roles of glycolytic enzymes in cell death. *Biochem Pharmacol*. 2014;92(1):22-30.
30. Prakasam G, Singh RK, Iqbal MA, Saini SK, Tiku AB, Bamezai RNK. Pyruvate kinase M knockdown-induced signaling via AMP-activated protein kinase promotes mitochondrial biogenesis, autophagy, and cancer cell survival. *J Biol Chem*. 2017;292(37):15561-76.
31. Cantor JR, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer Discov*. 2012;2(10):881-98.
32. Coloff JL, Murphy JP, Braun CR, Harris IS, Shelton LM, Kami K, et al. Differential Glutamate Metabolism in Proliferating and Quiescent Mammary Epithelial Cells. *Cell Metab*. 2016;23(5):867-80.
33. Cluntun AA, Lukey MJ, Cerione RA, Locasale JW. Glutamine Metabolism in Cancer: Understanding the Heterogeneity. *Trends Cancer*. 2017;3(3):169-80.
34. DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv*. 2016;2(5):e1600200.



35. Jeon SM, Chandel NS, Hay N. AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature*. 2012;485(7400):661-5.
36. Maddocks ODK, Athineos D, Cheung EC, Lee P, Zhang T, van den Broek NJF, et al. Modulating the therapeutic response of tumours to dietary serine and glycine starvation. *Nature*. 2017;544(7650):372-6.
37. Kalhan SC, Uppal SO, Moorman JL, Bennett C, Gruca LL, Parimi PS, et al. Metabolic and genomic response to dietary isocaloric protein restriction in the rat. *J Biol Chem*. 2011;286(7):5266-77.
38. Chaneton B, Hillmann P, Zheng L, Martin ACL, Maddocks ODK, Chokkathukalam A, et al. Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2. *Nature*. 2012;491(7424):458-62.
39. Mattaini KR, Sullivan MR, Vander Heiden MG. The importance of serine metabolism in cancer. *J Cell Biol*. 2016;214(3):249-57.
40. NCBI. [updated 8-Aug-2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/26227>.
41. Antonov A, Agostini M, Morello M, Minieri M, Melino G, Amelio I. Bioinformatics analysis of the serine and glycine pathway in cancer cells. *Oncotarget*. 2014;5(22):11004-13.
42. Mullarky E, Mattaini KR, Vander Heiden MG, Cantley LC, Locasale JW. PHGDH amplification and altered glucose metabolism in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2011;24(6):1112-5.
43. Pacold ME, Brimacombe KR, Chan SH, Rohde JM, Lewis CA, Swier LJ, et al. A PHGDH inhibitor reveals coordination of serine synthesis and one-carbon unit fate. *Nat Chem Biol*. 2016;12(6):452-8.
44. Engel AL, Lorenz NI, Klann K, Munch C, Depner C, Steinbach JP, et al. Serine-dependent redox homeostasis regulates glioblastoma cell survival. *Br J Cancer*. 2020;122(9):1391-8.

45. DeNicola GM, Chen PH, Mullarky E, Sudderth JA, Hu Z, Wu D, et al. NRF2 regulates serine biosynthesis in non-small cell lung cancer. *Nat Genet.* 2015;47(12):1475-81.
46. Hemocytometer protocol 2013 [Available from: <https://www.hemocytometer.org/hemocytometer-protocol/>].
47. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
48. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996;6(10):986-94.
49. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 1996;6(10):995-1001.
50. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.
51. Brunelle E, Le AM, Huynh C, Wingfield K, Halámková L, Agudelo J, et al. Coomassie Brilliant Blue G-250 Dye: An Application for Forensic Fingerprint Analysis. *Anal Chem.* 2017;89(7):4314-9.
52. Eastman A. Improving anticancer drug development begins with cell culture: misinformation perpetrated by the misuse of cytotoxicity assays. *Oncotarget.* 2017;8(5):8854-66.
53. Mirzayans R, Murray D. Intratumor Heterogeneity and Therapy Resistance: Contributions of Dormancy, Apoptosis Reversal (Anastasis) and Cell Fusion to Disease Recurrence. *Int J Mol Sci.* 2020;21(4).
54. Milkovic L, Tomljanovic M, Cipak Gasparovic A, Novak Kujundzic R, Simunic D, Konjevoda P, et al. Nutritional Stress in Head and Neck Cancer Originating Cell Lines: The Sensitivity of the NRF2-NQO1 Axis. *Cells.* 2019;8(9).
55. Krzystek-Korpacka M, Hotowy K, Czapinska E, Podkowik M, Bania J, Gamian A, et al. Serum availability affects expression of common house-

keeping genes in colon adenocarcinoma cell lines: implications for quantitative real-time PCR studies. *Cytotechnology*. 2016;68(6):2503-17.

56. Jun DY, Park HS, Lee JY, Baek JY, Park HK, Fukui K, et al. Positive regulation of promoter activity of human 3-phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) gene is mediated by transcription factors Sp1 and NF-Y. *Gene*. 2008;414(1-2):106-14.

57. Mojzeš A, Tomljanović M, Milković L, Kujundžić RN, Gašparović AČ, Trošelj KG. Cell-Type Specific Metabolic Response of Cancer Cells to Curcumin. *Int J Mol Sci*. 2020 Feb 28;21(5):1661.

58. Niepel M, Hafner M, Duan Q, Wang Z, Paull EO, Chung M, Lu X, Stuart JM, Golub TR, Subramanian A, Ma'ayan A, Sorger PK. Common and cell-type specific responses to anti-cancer drugs revealed by high throughput transcript profiling. *Nat Commun*. 2017 Oct 30;8(1):1186.

59. Locasale JW, Grassian AR, Melman T, Lyssiotis CA, Mattaini KR, Bass AJ, et al. Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat Genet*. 2011;43(9):869-74.

60. Jia XQ, Zhang S, Zhu HJ, Wang W, Zhu JH, Wang XD, et al. Increased Expression of PHGDH and Prognostic Significance in Colorectal Cancer. *Transl Oncol*. 2016;9(3):191-6.

61. Wang C, Wan X, Yu T, Huang Z, Shen C, Qi Q, et al. Acetylation Stabilizes Phosphoglycerate Dehydrogenase by Disrupting the Interaction of E3 Ligase RNF5 to Promote Breast Tumorigenesis. *Cell Rep*. 2020;32(6):108021.