

Stacjonarne Studia Doktoranckie

Genetyki Molekularnej, Cytogenetyki i Biofizyki Medycznej

Joanna Sarnik

Komórkowe i molekularne mechanizmy działania farmakoforów węglowodanowych zawierających siarkę

Cellular and molecular mechanisms of action of sulfurcontaining carbohydrate pharmacophores

Praca doktorska wykonana w Katedrze Genetyki Molekularnej UŁ Instytut Biochemii UŁ pod kierunkiem dr hab. Tomasza Popławskiego , prof. UŁ



Pragnę podziękować mojemu promotorowi Profesorowi Tomaszowi Popławskiemu za wszelką pomoc, opiekę merytoryczną i poświęcony czas.

Dziękuję zespołowi Uniwersytetu Wilkes, w szczególności Profesorowi Zbigniewowi J Witczakowi.

Składam też serdeczne podziękowania pracownikom, koleżankom i kolegom z Uczelni, a w szczególności Paulinie Tokarz, Annie Czubatce-Bieńkowskiej i Annie Macieja, za pomocną dłoń, życzliwość i wspaniałą koleżeńską atmosferę.

Pracę dedykuję mojej kochanej Rodzinie, w podziękowaniu za wsparcie i motywację.

SPIS TREŚCI

Informacje wprowadzające	3
Źródła finansowania	3
Dorobek naukowy	4
Wstęp	9
Cel pracy	10
Materiały i metody	11
Opis wyników	16
Podsumowanie wyników	21
Wnioski	23
Literatura uzupełniająca:	24
Streszczenie	25
Summary	27
Publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej	29
Oświadczenia współautorów	69

INFORMACJE WPROWADZAJĄCE

Źródła finansowania

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zostały sfinansowane z następujących źródeł:

- Grant Narodowego Centrum Nauki przyznany w ramach konkursu PRELUDIUM 8 nr 2014/15/N/NZ7/02948 "Ocena właściwości przeciwnowotworowych tiocukrów" Kierownik – mgr Joanna Sarnik
- Grant Narodowego Centrum Nauki przyznany w ramach konkursu OPUS 1nr 2011/01/B/NZ4/03391 "Modulacja przez tiocukry naprawy DNA indukowanej lekami używanymi w terapii nowotworów" Kierownik – dr hab. Tomasz Popławski prof. UŁ



 Dotacja celowa na finansowanie działalności polegającej na prowadzeniu badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich przyznana przez Dziekana Wydziału BiOŚ UŁ



 Pracę realizowano we współpracy z Katedrą Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Wilkes, USA

Dorobek naukowy

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

W skład rozprawy doktorskiej wchodzą trzy publikacje doświadczalne i jedna przeglądowa:

 Witczak ZJ, Sarnik J, Czubatka A, Forma E, Poplawski T. Thio-sugar motif of functional CARB-pharmacophore for antineoplastic activity. Part 2. Bioorg Med Chem Lett. 2014 Dec 15;24(24):5606-5611. doi: 10.1016/j.bmcl.2014.10.095
 IF 2,454; IF 5-letni 2,286; 30 pkt

Sarnik J, Czubatka-Bieńkowska A, Dziadek J, Witczak ZJ, Popławski T. Thiosugars used as drugs. [Article in Polish] Postępy Biochem. 2016;62(4):526-534.

5 pkt

 Sarnik J, Czubatka-Bienkowska A, Macieja A, Bielski R, Witczak ZJ, Poplawski T. The induction of oxidative stress in cervix carcinoma cells by levoglucosenone derived 4-S-salicyl derivative and (1-4)-S-thio-disaccharides. Part 4. Bioorg Med Chem Lett. 2017 Mar 1;27(5):1215-1219. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.01.064.

IF 2,454; IF 5-letni 2,286; 30 pkt

 Sarnik J, Gajek A, Toma M, Pawelczyk J, Rykowski S, Olejniczak A, Sliwinski T, Bielski R, Witczak ZJ, Poplawski T. (1-4)-Thiodisaccharides as anticancer agents. Part 5. Evaluation of anticancer activity and investigation of mechanism of action. Bioorg Med Chem Lett. 2019 Dec 17:126904. doi: 10.1016/j.bmcl.2019.126904

IF 2,448; IF5-letni 2,352; 70 pkt (wg nowej punktacji)

Suma: IF 7,356; IF 5-letni 6,924; 65 pkt + 70 pkt MNiSW (wg nowej punktacji)

Publikacje:

 Sakowski S, Krasinski T, Waldmajer J, Sarnik J, Blasiak J, Poplawski T. Biomolecular computers with multiple restriction enzymesGenet Mol Biol. 2017 Oct-Dec;40(4):860-870

IF 1,493; IF 5-letni 1,857; 15 pkt

- Czubatka-Bieńkowska A, Sarnik J, Macieja A, Galita G, Witczak ZJ, Poplawski T.Thio-functionalized carbohydrate thiosemicarbazones and evaluation of their anticancer activityBioorg Med Chem Lett. 2017 Jun 15;27(12):2713-2720 IF 2,454; IF 5-letni 2,286; 30 pkt;
- Sakowski S, Krasiński T, Sarnik J, Blasiak J, Waldmajer J, Poplawski. T A detailed experimental study of a DNA computer with two endonucleasesZ Naturforsch C. 2017 Jul 14;72(7-8):303-313

IF 0,882; IF 5-letni 0,912; 15 pkt

 Czubatka-Bienkowska A, Macieja A, Sarnik J, Witczak ZJ, Poplawski T. The oxidative induction of DNA lesions in cancer cells by 5-thio-d-glucose and 6-thio-d-fructopyranose and their genotoxic effects. Part 3Bioorg Med Chem Lett. 2017 Mar 1;27(5):1210-1214

IF 2,454; IF 5-letni 2,286; 30 pkt

- Szejk M, Poplawski T, Sarnik J, Pawlaczyk-Graja I, Czechowski F, Olejnik AK, Gancarz R, Zbikowska HM. Polyphenolic glycoconjugates from medical plants of Rosaceae/Asteraceae family protect human lymphocytes against γradiation-induced damageInt J BiolMacromol. 2017 Jan;94(Pt A):585-593
 IF 3,909; IF 5-letni 3,929; 35 pkt
- Poplawski T, Sobczuk A, Sarnik J, Pawlowska E, Blasiak J. Polymorphism of DNA mismatch repair genes in endometrial cancerExpOncol. 2015 Mar;37(1):44-7
- 7. Czubatka A, **Sarnik J**, Lucent D, Blasiak J, Witczak ZJ, Poplawski T. A novel carbohydrate derived compound FCP5 causes DNA strand breaks and

oxidative modifications of DNA bases in cancer cellsChemBiol Interact. 2015 Feb 5;227:77-88

IF 3,143; IF 5-letni 3,180; 25 pkt

 Witczak ZJ, Poplawski T, Czubatka A, Sarnik J, Tokarz P, Van Wert AL, Bielski R. A potential CARB-pharmacophore for antineoplastic activity: part 1Bioorg Med Chem Lett. 2014 Apr 1;24(7):1752-7
 IF 2,454; IF 5-letni 2,286; 30 pkt;

Sumaryczny dorobek naukowy: IF 24,145; IF 5-letni 23,660; 245 pkt + 70 pkt MNiSW (wg nowej punktacji) IH=4 (źródło: Web of Science)

Wybrane komunikaty zjazdowe:

- Sarnik J, Macieja A, Witczak ZJ, Popławski T (1-4)-S-thiodisaccharides induced ER stress which is a mechanism behind the death of glioblasatoma cells/ American Chemical Society National Meeting & Exposition 31.03-14.14.2019 Orlando, USA
- Sarnik J, Toma M, Macieja A, Śliwiński T, Witczak ZJ, Popławski T/ (1-4)-Sthiodisaccharides as potential anti-glioma drugs; 29th International Carbohydrate Symposium 14-19.07.2018 (Pharmaceuticals Best Poster Award) Lizbona, Portugalia
- Brzezińska O, Macieja A, Lewandowska-Polak A, Sarnik J, Kubicka M, Makowska J/ Evaluation of sensitivity to DNA damaging agents and efficiency of DNA repair in human peripheral blood mononuclear cells from patient with dermatomyositis and polymyositis; EULAR- European Congress of Rheumatology 13-16.06.2018 Amsterdam, Holandia
- Macieja A, Brzezińska-Pawłowska O, Lewandowska-Polak A, Sarnik J, Pabijańczyk W, Popławski T, Makowska J/ Zwiększon awrażliwość DNA monocytów krwi obwodowej na uszkodzenia u pacjentów z chorobami reumatycznymi. XXIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Reumatologicznego 21-23.09.2017 Szczecin, Polska
- 5. **Sarnik J,** Czubatka-Bieńkowska A, Macieja A, Witczak ZJ, Popławski T/ Inhibitory effect of Functional CARB-pharmacophores with sulfur atom on proliferation

of cancer cell; EUROBIOTECH – 6THCental European Congress of Life Science 11-14.09.2017 Kraków, Polska

- Sarnik J,Czubatka-Bieńkowska A, Macieja A, Witczak ZJ, Popławski T/ Functional CARB-pharmacophores with sulfur bridge modulate redox homeostasis in glioblastoma cell; 19TH EUROCARB Conference 02-06.07.2017 Barcelona, Hiszpania
- Sarnik J, Toma M, Śliwiński T, Witczak ZJ, Popławski T/ Thiodisaccharides as anticancer agents in astrocytomas treatment; 20th Gliwice Scientific Meetings 18-19.11.2016 Gliwice, Polska
- Sarnik J, Czubatka-Bieńkowska A, Macieja A, Witczak ZJ, Popławski T/ Novel thiosugar analog act as potent anticancer agent in cervical cancer cells through induction of oxidative stress; ICS 2016 17-21.07.2016 Nowy Orlean, USA
- Sarnik J, Czubatka-Bieńkowska A, Macieja A, Witczak ZJ, Popławski T/ Analiza zmian ekspresji genów kodujących białka biorące udział w odpowiedzi na stress oksydacyjny w komórkach nowotworowych inkubowanych z tiodisacharydami; Bioopen II Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu 12-14.05.2016 Łódź, Polska
- 10. Sarnik, Macieja A, Czubatka-Bieńkowska A, Witczak ZJ, Popławski T/ Działanie genotoksyczne siarkowych analogów węglowodanów w komórkach raka szyjki macicy I niedrobnokomórkowego raka płuc; V Konferencja Biologii Molekularnej 07-09. 04.2016 Łódź, Polska
- Sarnik J, Czubatka-Bieńkowska A, Macieja A, Witczak ZJ, Popławski T/ Analysis of expression of genes involved in oxidative stress response caused by thiodisaccharides; International Student Conference of Cell Biology 01-02. 04.2016 Kraków, Polska
- 12. Sarnik J, Macieja A, Czubatka A, Witczak ZJ, Popławski T/ Thiodisaccharides induced oxidative stress and DNA lesions in cancer cells; International Student Conference of Cell Biology 22-23.05.2015 Kraków, Polska
- 13. Sarnik J, Macieja A, Czubatka A, Witczak ZJ, Popławski T/ Oxidative stress induction as a potential anticancer properties of thiodisaccharides; I Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen 20-22.04.2015 Łódź, Polska

- Sarnik J, Macieja A, CzubatkaA, Witczak ZJ, Popławski T/ Genotoksyczność tiodisacharydów w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc (A549);
 IV Konferencja Biologii Molekularnej 26-28.03.2015 Łódź, Polska
- 15. Sarnik J, Czubatka A, Poplawski T, Witczak ZJ/ Thio-sugars can sensitize human cervixadenocarcinoma (Hela) cancer cells to Bleomycin and ROSgenerator; 249th American Chemical Society National Meeting & Exposition 22-26.03.2015 Denver, USA
- 16. Sarnik J, Szulc M, Popławski T/ Znaczenie zmienności genetycznej miRNA w nowotworach głowy I szyi; VII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2015 21-22.03.2015 Łódź, Polska
- Sarnik J, Czubatka A, Witczak ZJ, Popławski T/ The evaluation of thio-disaccharides genotoxicity in human cervix adenocarcinoma (HeLa) cancer cell line; XVIII Gliwice Scientific Meetings 21-22.11.2014 Gliwice, Polska
- 18. **Sarnik J**, Sakowski S, Błasiak J, Krasiński T, Popławski T/ Construction of Biomolecular Computer with DNA and Restriction Enzymes; BIO2014 9-12.2014
- Sarnik J, Czubatka A, Witczak ZJ, Popławski T/ Porównanie aktywności cytotoksycznej pochodnych izoksazolu; II Sympozjum Doktorantów Chemii 7-8.05.2014 Łódź, Polska
- 20. Sarnik J, Czubatka A, Witczak ZJ, Popławski T/ Badania in vitro aktywności cytotoksycznej pochodnych izoksazolu; III Studencka Konferencja Biologii Molekularnej 20-22.03.2014 Łódź, Polska
- Sarnik J, Czubatka A, Witczak ZJ, Popławski T / Cytotoxicity of thiosugars in cencer cell lines; XV National Academic Seminar of Biotechnology Students & V International Conference of Biotechnology Students; 22-24.10.2013 Wrocław, Polska

Skrócony opis prowadzonych prac wraz z omówieniem wyników

Wstęp

Idea wykorzystania cząsteczek węglowodanów i ich pochodnych w celach terapeutycznych została rozwinięta wraz z identyfikacją lektyn, grupy białek, które charakteryzują się rozpoznawaniem i wiązaniem węglowodanów oraz wraz z opracowaniem nowych metod projektowania syntezy węglowodanów i ich pochodnych¹. Jedną z dróg nowych kierunków rozwoju chemii medycznej węglowodanów jest sfunkcjonalizowanie cząsteczek weglowodanów poprzez dodanie podstawników, które zmieniają aktywność biologiczną tak powstałych pochodnych węglowodanów i w konsekwencji decydują o interakcji z celami biologicznymi w komórkach. Takie podejście wpisać koncepcję farmakoforu. Pojęcie farmakoforu można W (ang. Pharmacophore) zostało wprowadzone przez P. Ehrlicha i definiowane jako szkielet molekularny niosący (phoros) podstawowe cechy odpowiedzialne za aktywność biologiczną leku (pharmacons)². Pojęcie to zostało poszerzone później przez IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) w tłumaczeniu jako zestaw właściwości sterycznych i elektronowych niezbędnych do zapewnienia optymalnych interakcji supramolekularnych z określonym celem biologicznym i do uruchomienia (lub zablokowania) jego odpowiedzi biologicznej³. Założenia tej koncepcji zostały wykorzystane między innymi podczas syntezy leków będących pochodnymi węglowodanów (związki CARB). W mojej pracy analizowałam związki CARB, które powstały poprzez zastąpienie w węglowodanach atomu tlenu atomem siarki. Takie związki nazywamy tiocukrami. Atom siarki w tiocukrach może występować jako heteroatom lub jako atom tworzący wiązanie S-glikozydowe, łączące węglowodany proste lub inne podstawniki. W układzie okresowym pierwiastków chemicznych siarka usytuowana jest w tej samej grupie (drugiej) obok tlenu. Porównując atom tlenu i siarki pierwszy jest dużo mniejszy i bardziej elektroujemny (2,6 vs. ten 3,5). Układ węgiel-siarka-węgiel ma również inne kąty niż węgiel-tlen-węgiel (96-100° vs. 110-113°), dzięki czemu struktura tiocukru jest bardziej zakrzywiona w porównaniu do jego tlenowego analogu. Wiązanie węgiel–siarka jest dłuższe niż wiązanie węgiel–tlen

(1.8A vs. 1.43A). Zastąpienie atomu tlenu siarką zmienia właściwości biologiczne i fizykochemiczne takiej pochodnej i jest tolerowane przez systemy biologiczne. Taka zmiana znacząco wpływa na stabilność związku, zwiększając między innymi jego odporność na degradację enzymatyczną. Takie właściwości są pożądane u potencjalnych leków^{4,5}.

Tiocukry są wykorzystywane w leczeniu chorób układowych i infekcyjnych człowieka takich jak cukrzyca i zakażenia bakteryjne. Salcinol czy kotalanol wyizolowane z rośliny Salacia reticulata są inhibitorami α -glukozydazy stosowanymi w leczeniu cukrzycy⁶. Naturalnie występującymi antybiotykami o charakterze tiocukrów tiolaktomycyna^{7–9}. Tiocukry wykazują są albomycyna i również potencjał przeciwnowotworowy. 5-tio-D-glukoza obniża przeżywalność komórek nowotworowych w hodowli prowadzonej w warunkach hipoksji¹⁰. Efekt ten autorzy tłumaczą zablokowaniem transportu glukozy przez 5-tio-D-glukozę do wnętrza komórki i jej "zagłodzeniem". Należy jednak wspomnieć, że do tej pory nie została opracowana żadna użyciem pochodnych terapia przeciwnowotworowa Ζ węglowodanów funkcjonalizowanych siarką, a doniesienia na temat właściwości przeciwnowotworowych tiocukrów mają wyłącznie charakter badań podstawowych.

Cel pracy

Przedmiotem niniejszej pracy doktorskiej była ocena komórkowych i molekularnych mechanizmów działania farmakoforów węglowodanowych zawierających siarkę.

Badania te prowadzono we współpracy z Katedrą Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Wilkes, USA.

Cel pracy wpisuje się w światowy trend tworzenia i poszukiwania nowych ukierunkowanych terapii oparciu aktywności w ο związki 0 wysokiej Choroby przeciwnowotworowej. nowotworowe, pomimo proponowanych wystandaryzowanych terapii nadal zajmują drugie miejsce (za chorobami układu krążenia) wśród przyczyn zgonów. Standardowe terapie działają w oparciu o stosowanie związków o właściwościach inhibitorów receptorów hormonalnych czy czynników wzrostu oraz takich procesów jak angiogeneza, naprawa DNA i cykl komórkowy. Ważnym czynnikiem

w projektowaniu nowych standardów leczenia jest wysoka aktywność przeciwnowotworowa przy niskim stopniu skutków ubocznych terapii.

Podstawą hipotezy badawczej było założenie, że wybrane do badań sfunkcjonalizowane siarką węglowodany będą:

- transportowane do wnętrza komórek nowotworowych,
- przejawiać aktywność cytotoksyczną względem komórek nowotworowych,
- indukować śmierć komórek nowotworowych aktywując jeden ze szlaków śmierci komórkowej,
- hamować proliferację komórek nowotworowych w warunkach in vitro,
- indukować uszkodzenia DNA w komórkach nowotworowych.

Cel pracy realizowano w następujących etapach cząstkowych:

- określenie cytotoksyczności i genotoksyczności badanych związków w komórkach nowotworowych na przykładzie wybranych linii nowotworowych, oraz powiązanie ich aktywności z budową farmakoforu,
- określenie zdolności badanych związków do hamowania proliferacji komórek,
- określenie zdolności badanych związków do bezpośrednich interakcji z cząsteczką DNA,
- ocena zdolności badanych związków do indukcji procesu apoptozy lub nekrozy w komórkach nowotworowych,
- analiza odpowiedzi komórek nowotworowych na badane związki w kontekście zmian profilu ekspresji genów,
- analiza procesu transportu badanych związków do komórek nowotworowych.

Materiały i metody

Badania w warunkach in vitro przeprowadzono na liniach komórkowych:

- niedrobnokomórkowego raka płuc A549 (ATCC[®] CCL-185™),
- raka szyjki macicy HeLa (ATCC[®] CCL-2[™]),
- raka jelita grubego LoVo (ATCC[®] CCL-229[™]),
- raka piersi MCF7 (ATCC[®] HTB-22[™]),
- glejaka U-87MG (ATCC[®] HTB-14[™]),

- dwie linie glejaka wyprowadzone od pacjentów oznaczone jako H6PX i H7PX.
 Linie H6PX i H7PX reprezentują glejaka stopnia IV i zostały sklasyfikowane zgodnie z wytycznymi World Health Organization (WHO)¹¹,
- prawidłowa linia komórek nabłonkowych pochodzących z prostaty PNT2 linia immortalizowana SV40 (95012613HPA Culture Collections Sigma).

W pracy oceniano aktywność biologiczną czterech analogów siarkowych węglowodanów oznaczonych jako FCP (ang. Functional-CARB pharmacophore) o numerach porządkowych 6-9:

- FCP6: 1,6-anhydro-3-deoxy-4-S-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-4-thio-β-Derythro-hexopyranos-2-ulose,
- FCP7: 1,6-anhydro-3-deoxy-4-S-(β-D-glucopyranosyl)-4-thio-β-D-erythro-hexopyranos-2-ulose,
- FCP8: 1,6-anhydro-3-deoxy-4-S-(salicylyl)-4-thio-β-D-erythro-hexopyranos-2-ulose,
- FCP9: 1,6-anhydro-3-deoxy-4-S-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-4-thio-β-D-erythro-hexopyranos-2-ulose.

Związki FCP6, 7 i 9 są z punktu widzenia budowy określane jako (1-4) tiodisacharydy zawierające w swojej strukturze dwie cząsteczki węglowodanów prostych połączone atomem siarki. Różnica pomiędzy FCP6 i 7 związana jest z zabezpieczeniem grup hydroksylowych w pierścieniu cukrowym przez obecność grup acetylowych w FCP6. Elementem różniącym FCP6 i 9 jest natomiast zmiana cząsteczki glukozy na galaktozę. FCP8 jest związkiem różniącym się od pozostałych brakiem obecności drugiej cząsteczki cukru. Zamiast tego w pozycji C4 przyłączony jest podstawnik aromatyczny - kwas salicylowy. Wzory strukturalne związków przedstawiono na Rycinie 1.



Rycina 1. Wzory strukturalne badanych tiocukrów oznaczonych jako FCP

Realizując cel naukowy pracy oraz weryfikując hipotezy cząstkowe wybrane linie komórkowe nowotworowe i prawidłowe były inkubowane z badanymi związkami. Dokonano analizy następujących aspektów ich działania:

- cytotoksyczność (analiza spektrofotometryczna z użyciem testu kolorymetrycznego CCK-8),
- genotoksyczność (test kometowy w wersji alkalicznej, pH 12.1 i neutralnej, wykrywanie pęknięć w DNA metodą analizy zmian konformacyjnych plazmidu),
- zdolność do indukowania szlaków śmierci komórkowej właściwości proapoptotyczne (metoda cytometryczna z użyciem Annexin V –FITC oraz PI, ilościowy PCR w czasie rzeczywistym z sondami TaqMan dla genów kodujących białka biorące udział w szlaku apoptozy)
- zdolność do zahamowania proliferacji komórek (test klonogenności)
- zdolność do indukcji stresu oksydacyjnego właściwości pro-oksydacyjne (metoda spektrofluorymetryczna z sondami H2DCF-DA i DAF2-DA,

zmodyfikowany test kometowy z wykorzystaniem antyoksydantów: witaminy E i epikatechiny, poziom tioli w komórce za pomocą analizy spektrofotometrycznej z użyciem testu kolorymetrycznego DTNB),

- zdolność do indukcji zmian ekspresji genów kodujących kluczowe białka związane z odpowiedzią komórek na stres oksydacyjny na poziomie mRNA (ilościowy PCR w czasie rzeczywistym z sondami TaqMan).
- zdolność do hamowania mechanizmów ochronnych związanych z ochroną przed stresem oksydacyjnym: hamowanie aktywności reduktazy tioredoksyny TrxR (analiza spektrofotometryczna z użyciem testu kolorymetrycznego oraz metoda fluorescencyjna TRFS-GREEN.) oraz aktywności glutationu (metoda cytometryczna z użyciem Monochlorobimane - mBCl)
- zdolność do zahamowania syntezy białek (metoda fluorescencyjna z wykorzystaniem wyznakowanej metioniny Click-IT HPG Alexa Fluor[®] Protein Synthesis Assay Kit)
- zdolność do indukcji stresu retikulum endoplazmatycznego (ilościowy PCR w czasie rzeczywistym z sondami TaqMan dla genów biorących udział w odpowiedzi na stres retikulum endoplazmatycznego, test ELISA do określenia ekspresji na poziomie białka markerów biorących udział w odpowiedzi na stres retikulum endoplazmatycznego)
- transport FCP do komórek (metoda z wykorzystaniem związku wyznakowanego ³H trytem oraz 1450 Microbeta Plus Liquid Scintillation Counter)

Ogólny schemat doświadczeń przeprowadzonych w ramach realizacji celów niniejszej pracy doktorskiej i podzielony względem treści w publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej przedstawiono na Rycinie 2.

ANALIZA KOMÓRKOWYCH I MOLEKULARNYCH MECHANIZMÓW DZIAŁANIA FARMAKOFORÓW WĘGLOWODANOWYCH ZAWIERAJĄCYCH SIARKĘ

Т

1

\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
<u>Manuskrypt 1:</u> Thio-sugar motif of functional CARB-pharmacophore for antineoplastic activity. Part 2" <u>Model: A549, HeLa, MCF-7, LoVo</u> 1.Analiza cytotoksyczności • test kolorymetryczny CCK-8 2.Określenie mechanizmu śmierci komórki • test cytometryczny z wykorzystaniem aneksyny V z FITC oraz PI	<section-header><section-header><text><text></text></text></section-header></section-header>	Manuskrypt 1: The induction of oxidative stress in cervix carcinoma cells by levoglucosenone derived 4: Stress in cervix carcinoma cells by levoglucosenone derived 4: Stalicyl derivative and (1-4)-Stitio-disaccharides. Part 4" Model: HeLa Analiza genotoksyczności badanych czy Piest kometowy wersja alkaliczna, przy pł 12,1 oraz neutralna Acena interakcji z DNA Pocena interakcji z otka Asydacyjnego w komórkach cowotowotow Piest kometowy z antyoksydantami: wit E i cikatechina analiza ekspresji genów: ilościowy PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem com TaqMan analiza aktywności TrxR i poziomu GSH	 Manuskrypt 4: Stanicancer agents. Part 5. Staluation of anticancer activity and investigation of mechanism of action. Model: U-87, H6PX, H7PX Analiza cytotoksyczności test kolorymetryczny CK-8 test kolorgenności Określenie mechanizmu śmierci komórki test cytometryczny z wykorzystaniem aneksyny V z FITC oraz PI test cytometryczny z wykorzystaniem aneksyny V z FITC oraz PI test cytometryczny z wykorzystaniem Accena indukcji stresu oksydacyjnego H2DCF-DA analiza aktywności TrxR analiza poziomu tioli Acena indukcji stresu retikulum dnoplazmatycznego analiza zahamowania procesu syntezy kiałk ekspresja markerów białkowych ELISA testałki użycie związku wyznakowanego ³H

ANALIZA OTRZYMANYCH WYNIKÓW

Rycina 2. Schemat prac i metod wykorzystywanych w realizacji pracy doktorskiej (opracowanie własne).

Opis wyników

Pierwszy etap pracy miał charakter przesiewowy i dotyczył analizy potencjału przeciwnowotworowego badanych związków. W tym celu w pierwszej opublikowanej pracy wchodzącej w skład tej dysertacji [manuskrypt nr 1] dokonano analizy właściwości przeciwnowotworowych czterech związków FCP o numerach porządkowych 6-9 na modelu czterech linii komórek nowotworowych: A549, HeLa, LoVo, MCF7. Wszystkie badane związki wykazały aktywność cytotoksyczną w stężeniach mikromolarnych. Wśród badanych związków najwyższą cytotoksyczność względem badanych linii wykazywał związek FCP6. FCP6 indukował 50% spadek przeżywalności (wartość IC50 – ang. Half Maximal Inhibitory Concentration) wszystkich badanych linii w zakresie stężeń poniżej 200 µM. Liniami najbardziej wrażliwymi na działanie związku FCP6 były linie MCF7 (IC50=47,1 µM) i HeLa (IC50=91,4 µM). Zmiany strukturalne takie jak usunięcie grup acetylowych (FCP7), jak również zmiana cząsteczki glukozy na galaktozę (FCP9) nie powodowało zwiększenia cytotoksyczności związków. FCP8, który różni się budową od pozostałych obecnością kwasu salicylowego zamiast drugiej cząsteczki cukru w strukturze, również wykazywał właściwości cytotoksyczne w zakresie od 217,5 µM dla MCF-7 do 640,7 µM dla linii LoVo. Równocześnie badane związki nie były cytotoksyczne względem prawidłowej linii komórkowej PTEN2. Kolejną składową tej pracy była analiza właściwości pro-apoptotycznych badanych związków FCP na podstawie z użyciem aneksyny V-FITC i analizy cytometrycznej jodku propidyny. Aneksyna V wykazuje wysokie powinowactwo do fosfatydyloseryny. Fosfatydyloseryna jest eksponowana na powierzchni błony komórkowej w komórkach we wczesnych stadiach apoptozy. Jodek propidyny wnika do wnętrza komórek w późnych stadiach apoptozy oraz komórek w nekrozie. Wszystkie badane FCP w zakresie stężeń IC20 i IC50 FCP indukowały apoptozę, przy czym efekt ten był najsilniejszy w przypadku FCP6.

Kolejnym etapem pracy była analiza mechanizmów działania badanych **FCP**. Do dalszej analizy aktywności przeciwnowotworowej i jej molekularnych mechanizmów wybrano linię komórkową HeLa z powodów technicznych (łatwość hodowli w porównaniu do linii MCF-7) i satysfakcjonującej aktywności przeciwnowotworowej **FCP**. Pierwszym elementem składowym kolejnej pracy doświadczalnej [manuskrypt nr 3] była analiza właściwości genotoksycznych badanych **FCP**. Do tego etapu wykorzystano test kometowy

w 3 modyfikacjach: wersja alkaliczna, wersja przy pH 12,1 oraz wersja neutralna pozwalających na wykrycie różnego spektrum uszkodzeń DNA. FCP indukowały uszkodzenia DNA w komórkach nowotworowych, a efekt ten był proporcjonalny do stężenia związków. Na podstawie analizy spektrum uszkodzeń wykrytych za pomocą testu kometowego wykazano, że badane FCP indukują głównie pęknięcia pojedyncze DNA jak również miejsca alkalicznie labilne. W kolejnym etapie pracy zweryfikowano czy badane FCP indukują uszkodzenia DNA pośrednio czy bezpośrednio reagując z cząsteczką DNA wykorzystując metodę analizy zmian konformacyjnych plazmidu. Test konformacyjny z wykorzystaniem plazmidu pUC19 przeprowadzony w warunkach in vitro wykluczył bezpośrednią interakcję badanych FCP z DNA. Analizy dokonano na podstawie obrazu wzoru prążkowego elektroforezy w żelu agarozowym plazmidu natywnego (kontrola negatywna) oraz po inkubacji plazmidu z FCP. Ponadto, porównano poziom uszkodzeń DNA indukowanych przez FCP w komórkach nowotworowych w temperaturze 37 °C i 4 °C. Wartości testu kometowego uzyskanego podczas inkubacji komórek nowotworowych z FCP w temperaturze 37 °C były większe od tych uzyskanych w warunkach 4 °C. Wyniki te, wraz z brakiem zmian konformacyjnych plazmidu sugerują, że właściwości genotoksyczne FCP zależą od stopnia aktywności metabolicznej komórek nowotworowych.

Za pomocą testu kometowego badano również kinetykę naprawy uszkodzeń wywołanych przez **FCP.** We wszystkich przypadkach komórki nowotworowe miały zdolność do naprawy uszkodzeń DNA do poziomu 90 % naprawionych uszkodzeń indukowanych przez **FCP**. Taki profil genotoksyczny jest tożsamy dla związków indukujących stres oksydacyjny w komórce i sugeruje właściwości pro-oksydacyjne **FCP**.

W celu weryfikacji tej hipotezy badawczej w pierwszej kolejności wykonano zmodyfikowaną wersję testu kometowego z wykorzystaniem dwóch antyoksydantów: witaminy E i epikatechiny. Preinkubacja z antyoksydantami spowodowała zmniejszenie poziomu uszkodzeń DNA indukowanych przez **FCP** w stosunku do komórek, które nie były inkubowane z witaminą E i epikatechiną. Najwyższą wartość redukcji uszkodzeń DNA na poziomie powyżej 80 % zaobserwowano dla **FCP7** dla obu antyoksydantów, najniższą na poziomie 50 % zaobserwowano dla **FCP8** w przypadku epikatechiny. Realizując kolejny etap pracy analizowano stres oksydacyjny w komórce z wykorzystaniem sond fluorescencyjnych do wykrywania poziomu reaktywnych form tlenu H2DCF-DA i azotu

DAF2-DA w komórkach. Po inkubacji komórek HeLa z FCP 6, 7 i 9 zaobserwowano istotny statystycznie wzrost fluorescencji w próbkach z H2DCF-DA będący wyznacznikiem obecności reaktywnych form tlenu, natomiast dla DAF2-DA istotny statystycznie wynik uzyskano tylko dla FCP7. Wyniki te oznaczają, że reaktywne formy tlenu powstają w komórkach w wyniku ich inkubacji z FCP. Ze względu na możliwą indukcję stresu oksydacyjnego przez badane związki, w kolejnej części pracy przeanalizowano ekspresję 13 genów aktywowanych w celu utrzymania homeostazy redoks w komórce: SOD1, SOD2, HMOX-1, GCLM, TXN, FHL2, NCOA7, NQO1, NOX4, NOX5, CAT, GPX1, GPX4. Względny poziom mRNA genów uzyskano przy pomocy ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym z zastosowaniem sond TaqMan. Wyniki normalizowano do wartości uzyskanych dla genu referencyjnego GAPDH. Stwierdzono podwyższony poziom ekspresji genów: HMOX-1, GCLM, SOD1, SOD2, NQO1 i GPX4 w komórkach inkubowanych z FCP w porównaniu do komórek hodowanych w czystej pożywce. W jaki sposób FCP indukują stres oksydacyjny? Mechanizm działania tiocukrów w komórce może być związany z ich przekształceniem do sulfotlenków i hemitioacetali, które łatwo reagują ze związkami zawierającymi wiązania nienasycone i grupy tiolowe tworząc disiarczki poprzez połączenie z innymi związkami zawierającymi atom siarki. Efektem tego może być inhibicja procesów metabolicznych w komórce, których efektywność zależy od atomu siarki lub obecności wiązań nienasyconych. Przykładem mogą być tutaj mechanizmy komórkowe odpowiadające za utrzymanie homeostazy redoks w komórce. Utrzymanie potencjału redoks w komórce wymaga współdziałania i wydolności enzymatycznych i nieenzymatycznych systemów anty-oksydacyjnych, takich jak glutation czy też układu tioredoksyna-reduktaza tioredoksyny. Zaburzenie tych komórkowych systemów antyoksydacyjnych, może prowadzić do nagromadzenia reaktywnych form tlenu w komórce a w konsekwencji skutkować apoptozą. Weryfikując tą hipotezę badawczą wstępnie założono, że stres oksydacyjny może być wynikiem interferencji FCP (poprzez atom siarki) z komponentami komórkowymi odpowiedzialnymi za utrzymanie homeostazy redoks takimi jak glutation i układ tioredoksyna-reduktaza tioredoksyny. Aby zweryfikować tą hipotezę badawczą przeprowadzono pomiar deplecji glutationu na podstawie pomiaru poziomu fluorescencji GSH-mBCl w komórkach HeLa indukowanych z FCP. Wszystkie badane związki wywoływały istotną statystycznie deplecję glutationu. Ponadto w komórkach HeLa inkubowanych z FCP stwierdzono zmniejszenie aktywności reduktazy

tioredoksyny (TrxR) za pomocą testu kolorymetrycznego. Podsumowując tą część pracy stwierdzono, że z grupy badanych **FCP** najbardziej efektywnie działającym związkiem jest **FCP6**, którego mechanizm przeciwnowotworowy może być związany z destabilizacją systemu redoks w komórce.

W ostatniej pracy [manuskrypt nr 4] pogłębiono analizę mechanizmu działania FCP6. Analiza została przeprowadzona na modelu trzech linii komórkowych glejaków: komercyjnie dostępna linię glejaka U-87 oraz dwie nowe linie glejaków wyprowadzone od pacjentów oznaczone jako H6PX i H7PX. Model glejaków jako nowotworów do analizy mechanizmu działania FCP6 wybrano na podstawie wyników własnych, wcześniejszych badań sugerujących wysoką aktywność przeciwnowotworową tiocukrów w stosunku do glejaków. W pierwszym etapie tej pracy potwierdzono cytotoksyczność oraz wykazano zdolności hamowania proliferacji glejaków przez FCP6 za pomocą testu kolorymetrycznego i testu klonogenności. Podobnie jak w przypadku innych, badanych w pierwszym manuskrypcie linii komórkowych, FCP6 indukował apoptozę w komórkach glejaka. Ponadto, w komórkach glejaka inkubowanych w obecności FCP6 zaobserwowano zmianę profilu ekspresji genów kodujących białka zaangażowane w proces apoptozy: BCL2 I FASLG. Za pomocą sondy H2DCF-DA potwierdzono również dwukrotny wzrost reaktywnych form tlenu w komórkach glejaka po inkubacji z FCP6 wszystkich badanych linii w porównaniu do kontroli negatywnej. Kolejnym etapem była analiza wpływu FCP6 na układ tioredoksyna-reduktaza tioredoksyny. Na tym etapie wykorzystano dwie metody – kolorymetryczną oraz fluorescencyjną służące do oznaczenia aktywności TrxR w żywych komórkach. W metodzie kolorymetrycznej zaobserwowano spadek aktywności TrxR we wszystkich trzech badanych liniach komórkowych. Wyniki te potwierdzono metodą fluorescencyjną wykorzystującą sondę TRFS-GREEN – zaobserwowano spadek fluorescencji we wszystkich badanych liniach komórkowych glejaka. Następnym doświadczeniem było przeprowadzenie analizy wewnątrzkomórkowego poziomu tioli w komórkach inkubowanych z FCP6. Zmniejszenie ogólnego poziomu tioli w komórce może mieć dramatycznie skutki dla jej funkcjonowania – grupy tiolowe nadają biologiczne funkcje systemów zapewniających homeostazę redoks komórki i są niezbędne do syntezy białek między innym do prawidłowego fałdowania białek jako element mostków disiarczkowych. We wszystkich badanych liniach komórkowych zaobserwowano redukcję poziomu tioli po inkubacji z FCP6.

Kolejną hipotezą badawczą wynikającą ze wcześniejszych obserwacji było powiązanie zwiększonego stresu oksydacyjnego i zmniejszonej dostępności grup tiolowych z procesem syntezy białek. W komórkach inkubowanych z FCP6 metodą fluorescencyjną opartą na zmodyfikowanej metioninie zaobserwowano zmniejszenie tempa procesu syntezy białek. W literaturze naukowej brak jest jakichkolwiek informacji o hamowaniu funkcji rybosomów przez tiocukry, wstępnie więc założono, że tiocukry mogą interferować z procesem syntezy białka na etapie ich składania w retikulum endoplazmatycznym (RE). Takie zaburzenie homeostazy RE powinno skutkować stresem RE i uruchomieniem szlaku adaptacyjnej odpowiedzi na stres (ang. Unfolded Protein Response, UPR), którego podstawową rolą jest podtrzymanie przeżycia komórki i przywrócenie równowagi w obrębie RE poprzez ograniczenie gromadzenia się białek o nieprawidłowej strukturze przestrzennej. Weryfikując tą hipotezę badawczą dokonano analizy stresu RE w oparciu o markery białkowe oraz oznaczenie ekspresji markerów na poziomie mRNA. Wykazano, że **FCP6** po 1 h inkubacji indukuje wzrost ekspresji genów na poziomie mRNA biorących udział w odpowiedzi na akumulację nieprawidłowo złożonych białek: CHOP(DDIT3), GRP78, PDIA4 i EDEM. Po 2 h inkubacji utrzymywał się wzrost ekspresji GRP78 oraz wzrost ekspresji kolejnego markera UPR, genu DNAJC3. Aktywację markerów UPR zaobserwowano również na poziomie białka. Za pomocą testu ELISA wykazano wzrost poziomu białka GRP78, ATF4 i DDIT3(CHOP) oraz ufosforylowanej formy białka eIF2- α w czasie trwania inkubacji komórek glejaka z **FCP6**.

Ostatnim elementem analizy mechanizmu działania **FCP6** była ocena zdolności do transportu **FCP6** do wnętrza komórki nowotworowej i akumulacji. Do oznaczenia wykorzystano system 1450 Microbeta Plus Liquid Scintillation Counter i **FCP6** wyznakowany trytem (³H). Eksperyment przeprowadzono w trzech grupach: komórkach inkubowanych w 37 °C i w 4 °C oraz komórkach utrwalonych 4 % formaldehydem. Akumulacja **FCP6** była zaobserwowana tylko w przypadku komórek inkubowanych w 37 °C i była zależna od czasu inkubacji od wartości 5000 CPM do wartości ok. 15000 CPM po 2 h inkubacji z wyznakowanym **FCP6**. Wyniki te sugerują aktywny transport **FCP6** do komórki, niestety nie udało się zidentyfikować mechanizmu odpowiedzialnego za transport **FCP6** do wnętrza komórki nowotworowej.

Podsumowanie wyników

Uzyskane w pracy wyniki potwierdziły założenie, że badane farmakofory węglowodanowe zawierające siarkę posiadają potencjał przeciwnowotworowy.

W niniejszej pracy dokonano analizy aktywności 3 związków zawierających w swojej strukturze dwie cząsteczki cukru połączone mostkiem siarczkowym (FCP6, 7, 9) – 1-4-tiodisacharydy, oraz jednego związku zawierającego cząsteczkę cukru połączonego z motywem kwasu salicylowego poprzez atom siarki (FCP8). Różnice strukturalne w przypadku cząsteczek 1-4-tiodisacharydów wpływają na ich aktywność biologiczną – związek FCP6 zawierający w swojej budowie cząsteczkę glukozy zablokowaną czterema grupami acetylowymi wykazywał najwyższą aktywność cytotoksyczną względem badanych linii w porównaniu do pozostałych 1-4-tiodisacharydów w tym związku, który zamiast grup acetylowych posiada grupy hydroksylowe. Obecność grup acetylowych zwiększa liofilowość związku i tym samym jego potencjał farmakologiczny.

Mechanizm działania przeciwnowotworowego **FCP6** polega na aktywnym transporcie tego tiocukrów do wnętrza komórki nowotworowej. Tam na drodze β-eliminacji ulega przekształceniu do 1-tiocukru i lewoglukozanu lub hemitioacetalu. Produkty te mają wolną grupę tiolową i reagują z komponentami komórkowymi zawierającymi siarkę jak glutation i tioredoksyna zaburzając homeostazę redoks komórki i w konsekwencji indukując stres oksydacyjny. Dodatkowo produkty rozpadu lub metabolity **FCP6** hamują składanie białek i indukują system UPR. Ważną informacją jest tu brak wysokiej toksyczności **FCP6** w komórkach prawidłowych w stosunku do nowotworowych, jednak mechanizm oporności komórek prawidłowych na **FCP6** nie jest dobrze poznany, ale może stanowić podstawę do dalszych badań.

Uzyskane wyniki pozwoliły na identyfikację mechanizmów działania badanych farmakoforów węglowodanowych zawierający w strukturze atom siarki, a także dostarczyły informacji na temat potencjalnych możliwości wykorzystania ich w terapii przeciwnowotworowej. Pozwolą również na rozwój dalszych dróg syntezy związków w oparciu o informacje dotyczące najbardziej aktywnie działających podstawników –1-4tiodisacharydów. Aktywność biologiczna farmakoforów węglowodanowych zawierających siarkę jest nadal bardzo słabo poznaną dziedziną, dlatego uzyskane wyniki wniosły również istotny wkład w badania podstawowe tej grupy związków.

Wyniki tej pracy doktorskiej stanowią tym samym przyczynek do rozwoju podstaw chemii medycznej 1-4-tiodisacharydów dając możliwość w przyszłości na opracowanie nowych pochodnych o wyższym potencjale przeciwnowotworowym, i w dalszej drodze stosowanych jako potencjalne leki przeciwnowotworowe. Należy podkreślić, że tematyka badań związana z aktywnością przeciwnowotworową tej grupy związków, która została podjęta w pracy jest rzadko spotykana w skali światowej. Zapoczątkowane w pracy badania mogą stanowić punkt wyjścia do badań przeprowadzonych w warunkach *in vivo*.



Rycina 3. Schematyczne przedstawienie mechanizmu działania FCP6 (opracowanie własne). Wykorzystano obraz mikroskopowy komórek U-87 (opracowanie własne).

Wnioski

Uzyskane w pracy wyniki pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków końcowych:

- FCP6 ma właściwości cytotoksyczne, genotoksyczne, apoptogenne i prooksydacyjne wobec komórek nowotworowych;
- FCP6 zmniejsza zdolność komórki do neutralizowania wolnych rodników tlenowych zmniejszając aktywność systemów antyoksydacyjnych opartych na glutationie i tioredoksynie;
- FCP6 hamuje syntezę białek w komórce nowotworowej zaburzając składanie białek czego efektem jest stres retikulum endoplazmatycznego i odpowiedź komórki na akumulację nieprawidłowo złożonych białek;
- Obecność grup acetylowych przyłączonych do 1-4-tiodisacharydów zwiększa ich potencjał przeciwnowotworowy.

Literatura uzupełniająca:

- 1. Reina JJ, Bernardi A. Carbohydrate mimics and lectins: a source of new drugs and therapeutic opportunities. *Mini Rev Med Chem*. 2012;12(14):1434-1442. doi:10.2174/138955712803832690
- 2. Ehrlich P. Über den jetzigen Stand der Chemotherapie. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. 1909;42(1):17-47. doi:10.1002/cber.19090420105
- Wermuth CG, Ganellin CR, Lindberg P, Mitscher LA. Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). *Pure and Applied Chemistry*. 1998;70(5):1129–1143. doi:10.1351/pac199870051129
- 4. Fernandez-Bolaños JG, al-Masoudi NA, Maya I. Sugar derivatives having sulfur in the ring. *Adv Carbohydr Chem Biochem*. 2001;57:21-98. doi:10.1016/s0065-2318(01)57015-8
- ChemInform Abstract: Replacing the Ring Oxygen of Carbohydrates with Sulfur: Its Biological and Chemical Consequences - Yuasa - 1999 - ChemInform - Wiley Online Library. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/chin.199926300. Accessed January 15, 2020.
- Stohs SJ, Ray S. Anti-diabetic and Anti-hyperlipidemic Effects and Safety of Salacia reticulata and Related Species. *Phytother Res.* 2015;29(7):986-995. doi:10.1002/ptr.5382
- Lin Z, Xu X, Zhao S, et al. Total synthesis and antimicrobial evaluation of natural albomycins against clinical pathogens. *Nat Commun*. 2018;9(1):1-8. doi:10.1038/s41467-018-05821-1
- Pramanik A, Stroeher UH, Krejci J, et al. Albomycin is an effective antibiotic, as exemplified with Yersinia enterocolitica and Streptococcus pneumoniae. *International Journal of Medical Microbiology*. 2007;297(6):459-469. doi:10.1016/j.ijmm.2007.03.002
- Slayden RA, Lee RE, Armour JW, et al. Antimycobacterial action of thiolactomycin: an inhibitor of fatty acid and mycolic acid synthesis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40(12):2813-2819. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC163628/. Accessed January 15, 2020.
- 10. Bushway AA, Whistler RL. Repression of cancer cell growth by 5 thio D glucose. *Journal of Carbohydrates Nucleosides Nucleotides*. 1975;2:399-405.
- Sitarek P, Skała E, Toma M, et al. A preliminary study of apoptosis induction in glioma cells via alteration of the Bax/Bcl-2-p53 axis by transformed and non-transformed root extracts of Leonurus sibiricus L. *Tumour Biol*. 2016;37(7):8753-8764. doi:10.1007/s13277-015-4714-2

STRESZCZENIE

W przedstawionej pracy doktorskiej pt. "Komórkowe i molekularne mechanizmy działania farmakoforów węglowodanowych zawierających siarkę" poddano biologicznej analizie cztery zróżnicowane pod względem strukturalnym tiocukry. Badano właściwości przeciwnowotworowe trzech 1-4-tiodisacharydów (FCP6-9) oraz tiocukrów zwierającego motyw kwasu salicylowego (FCP8).

Głównym celem badań była ocena komórkowych i molekularnych mechanizmów działania farmakoforów węglowodanowych zawierających siarkę.

Szczegółowe badania, wykonane w warunkach in vitro, miały na celu:

- określenie cytotoksyczności i genotoksyczności badanych związków w komórkach nowotworowych na przykładzie wybranych linii nowotworowych, oraz powiązanie ich aktywności z budową farmakoforu,
- określenie zdolności badanych związków do hamowania proliferacji komórek,
- określenie zdolności badanych związków do bezpośrednich interakcji z cząsteczką DNA,
- ocenę zdolności badanych związków do indukcji procesu apoptozy lub nekrozy w komórkach nowotworowych,
- analizę odpowiedzi komórek nowotworowych na badane związki w kontekście zmian profilu ekspresji genów,
- analizę procesu transportu badanych związków do komórek nowotworowych.

Analizowano cytotoksyczne, cytostatyczne, pro-oksydacyjne, pro-apoptotyczne i genotoksyczne właściwości tiocukrów. Dodatkowo oznaczano wpływ wybranego związku na aktywność reduktazy tioredoksyny, glutationu, poziomu tioli i stresu retikulum endoplazmatycznego.

Badania wykonano na siedmiu liniach komórek nowotworowych:

- niedrobnokomórkowego raka płuc A549 (ATCC[®] CCL-185[™]),
- raka szyjki macicy HeLa (ATCC[®] CCL-2[™]),
- raka jelita grubego LoVo (ATCC[®] CCL-229[™]),
- raka piersi MCF7 (ATCC[®] HTB-22[™]),
- glejaka U-87MG (ATCC[®] HTB-14[™]),
- glejaka wyprowadzonego od pacjentów H6PX i H7PX,

 oraz jednej linii komórek prawidłowych PNT2 (95012613HPA Culture Collections Sigma).

Związkiem posiadającym największy potencjał przeciwnowotworowy jest związek **FCP6** – ma on właściwości cytotoksyczne, genotoksyczne, apoptogenne i pro-oksydacyjne wobec komórek nowotworowych. Jego mechanizm związany jest ze zmniejszaniem zdolność komórki do neutralizowania wolnych rodników tlenowych poprzez hamowanie aktywność systemów antyoksydacyjnych opartych na glutationie i tioredoksynie. Dodatkowo związek ten hamuje syntezę białek w komórce nowotworowej zaburzając składanie białek czego efektem jest stres retikulum endoplazmatycznego i odpowiedź komórki na akumulację nieprawidłowo złożonych białek. W kontekście porównania całej grupy badanej wywnioskowano, że obecność grup acetylowych przyłączonych do 1-4tiodisacharydów zwiększa ich potencjał przeciwnowotworowy.

Poznanie mechanizmu działania badanych FCP, a także aktywności związanej z ich strukturą daje możliwość w przyszłości na opracowanie nowych pochodnych o wyższym potencjale przeciwnowotworowym, jak również prowadzenie w przyszłości kolejnych etapów badań w warunkach *in vivo*.

SUMMARY

In the presented dissertation "Cellular and molecularmechanisms of action of sulfur-containing carbohydrate pharmacophores" four thiosugars derivative were subjected to biological analysis. The anticancer properties of 3 different derivatives 1-4-thiodisaccharides (FCP6-9) and one salicylic acid motif (FCP8) were investigated.

The main aim of investigations was to evaluate the cellular and molecular mechanisms of sulfur-containing carbohydrate pharmacophores.

Detailed studies in vitro, aimed at:

- determination of cytotoxicity and genotoxicity of studied thiosugars in cancer cells and correlation of their activity with the structure of thiosugars,
- assessment of the ability of studied thiosugars to inhibit cancer cell proliferation,
- analysis of studied thiosugars interaction with the DNA,
- evaluation of the ability of the studied thiosugars to induction of apoptosis or necrosis in cancer cells,
- analysis of cancer cell response to the studied thiosugars,
- evaluation of the transport of the studied thiosugars to the cancer cells.

Cytotoxic, cytostatic, pro-oxidative, pro-apoptotic and genotoxic properties of the thiosugars were investigated. In addition, the effects of thiosugars on the activity of thioredoxin reductase, glutathione, thiol levels and endoplasmic reticulum stress were also evaluated.

The study was performed on seven human cancer cell lines:

- human non-small lung adenocarcinoma (A549)
- human cervical carcinoma (HeLa)
- human colon cancer (LoVo)
- human brest adenocarcinoma (MCF-7)
- human glioma cells (U-87MG)
- two human glioma cel lines derived from cancer patients (H6PX and H7PX)
- and one normal human cell line (PNT2)

It was found that the compound with the highest anti-tumor potential has the **FCP6** compound – it has cytotoxic, genotoxic, apoptogenic, and pro-oxidative properties against cancer cells. Its mechanism is associated with reducing the cell's ability to

neutralize free oxygen radicals by inhibiting the activity of antioxidant systems based on glutathione and thioredoxin. Also, this compound inhibits the synthesis of proteins in a cancer cell by disrupting protein assembly, which results in the stress of the endoplasmic reticulum and cell response to the accumulation of abnormally complex proteins. In the context of comparing the entire study group, it was concluded that the presence of acetyl groups attached to 1-4-thiodisaccharides increases their anti-tumor potential.

Understanding the mechanism of action as well as the activity of the FCPs involved in their structure gives the opportunity in the future to develop new derivatives with higher anti-cancer potential, as well as to conduct subsequent stages in the future *in vivo*.

PUBLIKACJE BĘDĄCE PODSTAWĄ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 24 (2014) 5606-5611

Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl

Thio-sugar motif of functional CARB-pharmacophore for antineoplastic activity. Part 2 *

Zbigniew J. Witczak^{a,*}, Joanna Sarnik^b, Anna Czubatka^b, Ewa Forma^c, Tomasz Poplawski^{b,*}

^a Department of Pharmaceutical Sciences, Nesbitt School of Pharmacy, Wilkes University, 84.W. South Street, Wilkes-Barre, PA 18766, USA

^b Department of Molecular Genetics, University of Lodz, Lodz 90-236, Poland ^c Department of Cytobiochemistry, University of Lodz, 90-236 Lodz, Poland

Deputitient of Cytobiochemistry, Oniversity of Louz, 50-250 Louz, 10

ARTICLE INFO

Article history: Received 25 August 2014 Revised 27 October 2014 Accepted 29 October 2014 Available online 4 November 2014

Keywords: Functional CARB-pharmacophore (FCP) Thio-sugars 1-4-S-thiodisaccharides Cancer cell lines

ABSTRACT

Diverse functionalized representatives of (1-4)-S-thiodisaccharides, **6–9** were synthesized and assessed for cytotoxicity and apoptosis against human cancer cell lines (A549, LoVo, MCF-7 and HeLa). The FCP **6** was more active against MCF-7 cells (i.e., an estrogen-dependent breast cancer line), whereas other (1-4)-S-thiodisaccharides showed strongest activity against A549 cells (i.e., a lung adenocarcinoma line). We propose to use a concept of functional 'CARB-pharmacophores' when evaluating a potential for the compounds' general antineoplastic activity. Future studies will determine the reasons for cell-type specificity of these compounds. The thio-sugar motif appears to be a promising lead for future developments. © 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The 'sugar code' concept assumes the interaction of carbohydrates with cellular components.^{1,2} This concept is the basis of therapy employing carbohydrate-derived chemicals as drugs. The 'carb' pharmacological potential is enhanced by the addition of pharmacophores and functional groups. We proposed an idea of *'functional CARB-pharmacophore'* (FCP) as a new approach to examine biological response from functionalized sugar derivatives.³ CARB-pharmacophore (FCP) functionalized with sulfur atoms (thio-sugars) have garnered significant attention. Several reviews^{4–6} suggest that thio-sugars may have therapeutic potential in the treatment of a variety of pathological conditions such as infectious diseases including HIV-1,⁷ cancer⁸ and diabetes^{9–11} (α -glycosidase inhibitor activity).

In previous studies we designed several functionalized carbohydrates that are biologically active as α -fucosidase and α -glucosidase inhibitors, ^{9,10} and potentially as anticancer therapeutics.^{11,12}

Our previous studies showed that functionalized carbohydrates can decrease cancer cell viability, and some were taken under consideration as potential anticancer therapeutics because of their cell growth inhibitory activity.¹² In the newly selected group of FCPs we examined precursors of previously functionalized sulfones and sulfoxides of (1-4)-thiodisaccharides.¹²

In this study we present the results of research conducted on four cancer cells lines on the cytotoxicity and apoptosis induction ability of selected derivatives bearing a thio-sugar motif. Due to screening character of our study we decided to use cell lines representing various types of cancer including hormone-dependent and hormone-independent cancers. Those representative sets of cancer cell lines are commonly used in cytotoxicity studies and are well described including their genetic profile.

We consider FCPs as 'carbohydrate compounds containing specific chemical functional groups that render these compounds potentially therapeutically useful'.

The selected (1-4)-S-thiodisaccharides **6–9** are depicted in Scheme 1. Compounds **6**, **7**, and **9** were synthesized earlier^{11,12}



Scheme 1. (1-4)-S-thiodisaccharides 6-9





[☆] For Part 1. See Ref. 3.

^{*} Corresponding authors. Tel.: +1 570 4084276; fax: +1 570 408 4299 (Z.J.W.); tel.: +48 42 6354486; fax: +48 42 6354484 (T.P.).

E-mail addresses: zbigniew.witczak@wilkes.edu (Z.J. Witczak), tomasz.poplawski@biol.uni.lodz.pl (T. Poplawski).

via the thio-click approach, whereas compound **8** was prepared exclusively for this study.¹³ The rationale to synthesize compound **8** is the potential influence of the aromatic substituent at C-4, bearing –COOH group for the anticipated different and overall response from the cell proliferation assay. Additionally, phenyl carboxyl substituent is well known bioisosters group and pharmacophore present in many anti-inflammatory drugs. Additionally, there are no QSAR data for the thio linked molecules **6–9**.

The thiodisaccharides **6–9**, exhibit a broad range of $\log P$ values, which is very useful for the assessments of this parameter's role in their cytotoxicity level. The calculated $\log P$ and $\operatorname{Clog} P$ values clearly indicate their level of water solubility and fit the Lipinski's^{14–17} 'rules of five' for small molecules.

The crystal structure of the thiodisaccharide 6 (Fig. 1) clearly revealed the geometry of the molecule and the presence of a sulfur bridge at C1–C4.

Additionally, the calculated dihedral angles (Fig. 2) are in the expected ranges of 110° , 100° and 109° , respectively.

In contrast the dihedral angles calculated for disaccharide **8** are in the different range of 128° , 113° and 97° (Fig. 3). The anticipated different value of the dihedral angles of sulfur bridges of compound **6** and **8** is an important factor for the overall assessment of cytotoxicity.

Consequently, the obvious difference in the dihedral angles and stereochemical orientation of the 1-4-thio bridge is reflected in the much higher cytotoxicity for **6** and lower for **8**.

We believe that this important new observation and solid cytotoxicity data will help to formulate the plausible hypothesis on the relationship between value of the dihedral angles and cytotoxicity pointing out the differences in accessibility of both molecules **6** and **9** to the cancer cell lines.

However, this initial hypothesis must be further verified on the next set of functionalized thio-sugars pharmacophores.

The apoptosis induction for **6** exceeds that for **8** on all tested cell cultures.

The functional pharmacophore as defined¹⁸ plays an important role in the development of carbohydrate therapeutics and has been continuously improved and published.^{19–24}

The cytotoxicity of functional CARB-pharmacophore **6–9** was tested at nine different concentrations (≤ 2.2 mM) on four cell lines: lung, cervix, mammary gland-breast and colon carcinoma (A549, HeLa, MCF-7 and LoVo, respectively).

We chose the particular dose range of FCPs for two reasons. Firstly it fits NCI recommendations for a potential anticancer drug. Secondly it is similar to the dose range used in our previously



Figure 1. X-ray crystal structure of thio-disaccharide 6.



Figure 2. Bond angles of 1-4-thio bridge of disaccharide 6.



Figure 3. Bond angles of 1-4-thio bridge of disaccharide 8.

published studies as we expected the similar cytotoxicity. The characteristics of the studied cancer cells lines are presented in Table 1. Notice that functional CARB-pharmacophore containing thio-sugar motifs inhibited cell growth of all examined cell lines in micromolar concentrations as presented in Figure 4.

We found that the MCF-7 cell line was most sensitive to FCP as compared with other studied cancer cell lines (Table 2). The FCP 6, which has four hydroxyl groups in the sugar ring protected by acetyl groups, exhibits the highest cytotoxic activity (IC₅₀ 47.1 μ M). The hydroxyl group deprotection by removing the acetyl groups (FCP 7) and/or substitution of glucose with galactose (FCP 9) did not increase the cytotoxicity of compounds but increased its solubility. A similar cell killing scheme (FCP 6 was always the most toxic FCP) was observed with other studied cancer cell lines. FCP 8 represents another groups of thio-sugars equipped with benzoic acid instead of a second sugar molecule. It was also cytotoxic against cancer cell lines with micromolar IC_{50} values (Table 2). Anticancer agents kill cancer cells using a large variety of mechanisms. A common manifestation of anticancer drug activity is the induction of apoptosis. To test this possibility we employed a well-established and accepted apoptotic assay that is based on the translocation of phosphatidylserine to the outer leaflet of the plasma membrane. The phosphatidylserine was marked with green fluorescent dye by Annexin V/FITC complex. To distinguish

Characteristics of examined cell lines

Cell line	Tissue/disease	Туре	Culture properties	No. of cells/well
A549 HeLa	Lung/carcinoma Cervix/adenocarcinoma	Hormone-independent Hormone-dependent	Adherent Adherent	1×10^4 1×10^4
MCF-7	Mammary gland-breast/adenocarcinoma	Hormone-dependent	Adherent	5×10^4
LoVo	Colon/Duke's type C, grade IV, colorectal adenocarcinoma	Hormone-independent	Adherent	$2.5 imes 10^4$



Figure 4. The cytotoxicity of studied functional Carb-pharmacophores on A549, MCF7 LoVo and HeLa cells. The cytotoxicity was analyzed after 14 h incubation with FCP in 37 °C. WST-8 is reduced by dehydrogenases in viable cells and gives a yellow colored product—formazan, which was measured with microplate reader at 450 nM. Data represent the mean ± SEM of quadruplicate.

Table 2		
Cytotoxicity	of	FCP

A549 (µM)	HeLa (µM)	MCF-7 (µM)	LoVo (µM)
$IC_{50} = 119.4$	$IC_{50} = 91.4$	$IC_{50} = 47.1$	IC ₅₀ = 165.8
$IC_{50} = 691.5$	IC ₅₀ = 1077.7	IC ₅₀ = 365.9	IC ₅₀ = 771.9
$IC_{50} = 310.9$	$IC_{50} = 434.0$	IC ₅₀ = 217.5	$IC_{50} = 640.7$
$IC_{50} = 466.6$	$IC_{50} = 676.4$	IC ₅₀ = 343.9	$IC_{50} = 623.7$
	A549 (μ M) IC ₅₀ = 119.4 IC ₅₀ = 691.5 IC ₅₀ = 310.9 IC ₅₀ = 466.6	$\begin{array}{c c} A549 \ (\mu M) & HeLa \ (\mu M) \\ \hline IC_{50} = 119.4 & IC_{50} = 91.4 \\ IC_{50} = 691.5 & IC_{50} = 1077.7 \\ IC_{50} = 310.9 & IC_{50} = 434.0 \\ IC_{50} = 466.6 & IC_{50} = 676.4 \end{array}$	$\begin{tabular}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$

between dead and apoptotic cells propidium iodide was used. Green cells indicated apoptosis (down-right quadrat on histogram), red cells necrosis (upper-left quadrat on histogram), and red/green cells underwent the late stages of apoptosis or necrosis (upper-right quadrat on histogram) whereas live cells were unstained (down-left quadrat on histogram). Representative FACS histograms are presented in Figure 5. We saw increased populations of green (down-right quadrat) and red/green cells (upper-right quadrat) (Fig. 5C–J) as compared with the negative control (Table 3, Fig. 5A) after incubations of cancer cells with FCP but observed effect was differ than positive control (Fig. 5B). In conclusion, we observed late apoptosis but the mechanism which cells undergo apoptosis after incubations with FCP needs further study.

We also tested cytotoxicity of studied thio-sugars against normal cells as anticancer drugs should kill cancer cells selectively,



Figure 5. Flow cytometric analysis of FITC Annexin V staining. Untreated HeLa cells (human cervix adenocarcinoma) or were induced to undergo apoptosis by treatment with FCP (**6**–**9**) and 100 μ M camptothecin for 4 h. (a) Untreated HeLa cells; (b) HeLa treated with camptothecin at 100 μ M (positive control); (c) FCP **6**, 69 μ M; (d) FCP **6**, 8.6 μ M; (e) FCP **7**, 550 μ M; (f) FCP **7**, 69 μ M; (g) FCP **8**, 137 μ M; (h) FCP **8**, 17 μ M; (i) FCP **9**, 137 μ M; (j) FCP **9**, 17 μ M.

while sparing normal cells. The chosen thio-sugar concentrations corresponded to IC_{10} and IC_{50} values for the most sensitive cells, MCF-7. We decided to use human prostate normal PNT2 cells, immortalized with SV40, as they showed similar characteristics to studied cancer cells (adherent, epithelial). We found that normal cells are more resistant as compared to MCF-7 cells, as up to 10% of normal cells were killed (Fig. 6).

The results of this study show the therapeutic potential of the studied compounds as anticancer agents. We take into account the possibility that the activity of FCPs might be related to the inhibition of glycolysis in cancer cells. This is the best-known metabolic abnormality in cancer cells and is called Warburg effect. It is connected to increased glycolysis even in the presence of oxygen. Glycolysis results in a high production of lactic acid and acid-ification of the tissue, and thus the increase of the capacity of tumor cells to metastasize. Due to their sugar origin our FCPs could block glycolysis by inhibiting the cellular enzymatic machinery perhaps via the thio-sugar bond or inhibiting glucose-6-phosphate translocase. It was shown that stopping G6PT function in cancer cells decreased tumor progression and caused death.²⁵

The more cytotoxic potential of FCP **6** versus other compounds is surprising at first glance, but the compound has four acetyl groups and therefore has more the lipophilicity than the others. The lipophilicity may facilitate diffusion into the cell whereby normal cellular function can be perhaps be disrupted. In fact, it was recently demonstrated that a relationship exists between lipophilicity and antitumor activity, suggesting optimal lipophilicity as a critical factor in drug design.^{26,27} Taken together, FCP **6–9** are potential anti-tumor agents with low toxicity. Further studies should establish the mechanism of their cytotoxic activity. A starting point would be to assess the G2/M phase arrest and inhibition of cdc2 protein expression by FCPs, as this is one of the mechanism of cytotoxicity induced by compounds related to FCPs.²⁸

Cell culture and drug treatment: All cancer cell lines were cultured in DMEM (BioWhitaker) medium supplemented with penicillin–streptomycin mix (Sigma) and fetal bovine serum (BII). Human prostate normal PTEN2 cells were cultured in RPMI 1640 (Sigma) medium supplemented with penicillin–streptomycin mix (Sigma), 2 mM Glutamine (Sigma) and fetal bovine serum (BII).Cells were incubated in humidified incubator at 37 °C, 5% CO₂ and passaged at 80% confluence.

Cytotoxicity assay: The cytotoxicity was analyzed with colorimetric assay Cell Counting Kit 8 (CCK-8) from Dojindo (Sigma) after 14 h cells incubation with thio-sugars at concentrations varying from 8.6 to 2200 uM. Cell line was cultured in 96-well tissue culture plates (TPP) for at least 10 h prior to experiment. Table 1 shows the amount of cells seeded per well. Cells were incubated 14 h with thio-sugars after the formation of a monolayer in 96wells plate, then replaced by fresh medium with 10% CCK8 solution and incubated for 1-3 h. CCK-8 assay is based on dehydrogenase activity detected in viable cells. Water-soluble tetrazolium salt WST-8 was reduced by dehydrogenases in cell and gave a yellow product-formazan, which is soluble in medium. The number of living cells is proportional to the amount of formazan.²⁹ The absorbance was measured at 450 nm using microplate reader. Percentage of living cells was calculated using the formula: (S-B) $(K-B) \times 100\%$ = viability%, where S is absorbance from the probe, K is absorbance from control and B is blank. FCP 6, 7 and 9 were dissolved with the addition of DMSO. The final concentration of DMSO in samples did not exceed 0.1%. All experiments were repeated at least three times. Data are presented as mean ± SD and were analyzed by one-way ANOVA using Statistica software. The *P* value of <0.05 was considered statistically significant.

Apoptosis assay: Apoptosis was analyzed by staining protocol from FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit BD and flow cytometry. In early process of apoptosis cells lose their phospholipid membrane asymmetry and the membrane phospholipid phosphatidylserine (PS) is translocated to the cell surface, but with plasma membrane integrity intact. PS is exposed to the external cellular environment. Annexin V conjugated to fluorochrome FITC was used to monitor this process. Annexin V is a calcium-dependent phospholipid-binding protein with high affinity for PS. Exposure of PS occurs in the early stage of apoptosis, FITC Annexin V staining

Table 3

Apoptosis induction by functionalized CARB pharmacophores in human cancer lines

	Control	FCP 6		FCP 7 FCP 8		FCP 8	³ CP 8		FCP 9	
		17 μM	137 µM	69 µM	550 µM	69 µM	550 μM	34 µM	275 μM	
LoVo										
Viable cells (%)	79.50	72.50	69.70	71.00	62.35	70.90	37.80	65.10	70.00	
Apoptotic cells (%)	20.50	27.55	30.30	29.00	37.65	29.10	62.20	34.90	30.00	
	Control	FC	P 6	FCP 7		FC	FCP 8		FCP 9	
		8.6 µM	69 µM	69 µM	550 µM	34 µM	275 μM	17 µM	137 μM	
A549										
Viable cells (%)	84.40	76.40	75.80	70.30	74.30	72.60	62.20	71.00	78.10	
Apoptotic cells (%)	15.60	23.60	24.20	29.70	25.70	27.40	37.84	29.00	21.90	
	Control	FCP 6		FC	CP 7	FCP 8		FCP 9		
		4.3 μΜ	34 µM	34 µM	275 μM	17 µM	137 µM	34 µM	275 μM	
MCF7										
Viable cells (%)	70.40	63.10	68.75	75.10	26.40	60.90	37.50	57.80	80.80	
Apoptotic cells (%)	29.60	36.90	31.25	24.90	73.60	39.10	62.50	42.20	19.20	
	Control	FCP 6		FCP 7		FCP 8		FCP 9		
		8.6 µM	69 µM	69 µM	550 µM	17 µM	137 µM	17 µM	137 µM	
HeLa										
Viable cells (%)	87.00	80.00	63.10	82.60	67.20	75.50	74.20	74.10	37.20	
Apoptotic cells (%)	13.00	20.00	36.90	17.40	32.80	24.50	25.80	25.90	62.80	



Figure 6. The cytotoxicity of studied functional CARB-pharmacophores on PTEN2 normal cells. The cytotoxicity was analyzed after 14 h incubation with FCP in 37 °C. WST-8 is reduced by dehydrogenases in viable cells and gives a yellow colored product-formazan, which was measured with microplate reader at 450 nM. Data represent the mean ± SEM of quadruplicate. White bars-FCP concentration equal to IC10 value for MCF-7 cells, black bars-FCP concentration equal to IC50 value for MCF-7 cells.

can identify apoptosis at an earlier stage than assay based on nuclear changes such as DNA fragmentation. FITC Annexin V is used in mix with vital dye propidium iodide PI. The membranes of damage or dead cells are permeable to PI. The cells that considered viable are FITC Annexin V and PI negative, samples with cells in early apoptosis with membrane integrity intact are FITC Annexin positive and PI negative, and in end stage of apoptosis or death sample with cells are both FITC Annexin and PI positive. Cells which undergo necrosis and late apoptotic pathway were stained with both FITC Annexin and PI, 500×10^3 cells were seeded per well on the 6-wells tissue culture plate (TPP) 12 h prior to the experiment. After the monolayer formation cells were treated for 4 h with two concentrations of examined FCPs. Accutase (Sigma) was used for gentle cells detachment to avoid cell membrane destabilization that could influence experiment results. We used untreated cells stained with both FITC Annexin and PI as negative control. Cells treated with 100-µM camptothecin (topoisomerase I inhibitor) served as positive control. Then we followed FITC Annexin V staining protocol (BD Biosciences) and detected apoptosis using flow cytometry. Flow Jo software (Tree Star) was used to analyze the obtained results.

Statistical analyses: Statistics for Windows (10) evaluated statistical analyses. Data was expressed as mean SD. Comparisons were performed by one-way ANOVA test for normally distributed continuous variables and Tukey test was used for post hoc analyses of group differences.

Acknowledgments

This work was supported by Grant from The Polish National Science Centre, decision nr DEC-2011/01/B/NZ4/03391.

We thank Drs. Adam L. VanWert and Roman Bielski for helpful comments on the manuscript.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.10. 095.

References and notes

- 1. The Sugar Code Fundamental of Glycoscience; Gabius, H. J., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2009.
- Gabius, H. J.; Siebert, H. C.; Andre, S.; Jimenez-Barbero, J.; Rudiger, H. 2 ChemBioChem 2004, 5, 740.
- 3. Witczak, Z. J.; Poplawski, T.; Czubatka, A.; Sarnik, J.; Tokarz, P.; VanWert, A. L.; Bielski, R. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2014, 24, 1752.
- Witczak, Z. J. Curr. Med. Chem. 1999, 6, 159. 4.
- Robina, I.; Vogel, P.; Witczak, Z. J. Curr. Org. Chem. 2001, 5, 1177. 5
- 6.
- Witczak, Z. J.; Culhane, J. M. *Appl. Microbiol. Biotech.* **2005**, *69*, 237. Comber, R. N.; Friedrich, J. D.; Dunshee, D. A.; Petty, S. L.; Secrist, J. A., III *Carbohydr. Res.* **1994**, *262*, 245. 7.
- Guivsdalsky, P. N.; Bittman, R.; Smith, Z.; Blank, M. L.; Snyder, F.; Hoiward, S.; 8. Salari, H. I. Med. Chem. 1990, 33, 2614.
- Witczak, Z. J.; Sun, J.; Mielguj, R. Bioorg. Med. Chem. Lett. 1995, 5, 2169. 9
- 10.
- Witczak, Z. J.; Boryczewski, D. Bioorg. Med. Chem. Lett. **1998**, 8, 3265. Witczak, Z. J.; Chabra, R.; Chen, H.; Xie, X.-Q. Carbohydr. Res. **1997**, 301, 167. 11.
- 12. Witczak, Z. J.; Kaplan, P.; Dey, P. M. Carbohydr. Res. 2003, 338, 11.
- General procedure for the preparation of 8. To a solution of levoglucosenone 13. (252 mg, 0.2 mmol) in acetonitrile (10 mL) a solution of thiosalicylic acid (154 mg, 0.1 mmol) in 5 mL of acetonitrile was added and then triethyl amine 0.5 mL was added dropwise. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. After evaporation of the solvent, the syrupy residue was purified by column chromatography on silica gel. The fraction eluted with 20% EtOAc in hexane (v/v) to give pure syrupy product 8. Yield (314 mg, 89%), colorless syrup; $R_f = 0.69$ (1:4, hexane-EtOAc); $[\alpha]_D^{30}$ +134.2 (c 0.84, CHCl₃); HRMS (M) + m/z: Calcd for C₁₃H₁₂O₅S: 280.30. Found: 280.04. ¹H NMR: δ (400 MHz; CDCl₃), 2.75 (2H, t, H3'), 3.07 (d, 1H, C4'), 3.73 (1H, C6'), 3.98 (s, 1H, C6'), 5.76 (s 1H, C1'), 7.42 (m, 1H, H4), 7.60-7.69 (m 2H, H2, H3,) 8.30 (m, 1H,
H5), 11 (s, 1H, -OH). ¹³C NMR δ (100 MHz; CDCl3) 37.7 (s C3'), 38.7 (s C4'), 72.4 (s C6'), 90.9 (s C5'), 127.2 (s C1'), 202 (s C=0), 168.1 (s COOH), 142.6 (s C1), 126.7 (s C2), 134.1 (s C3), 125 (s C4), 133.2 (s C5), 126.5 (s C6).

- 14. Lipinski, C. A. J. Pharmacol. Toxicol. Methods 2000, 44, 235.
- 15. Lipinski, C. A. Drug Discov. Today Technol. 2004, 1, 337.
- 16. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Adv. Drug Deliv. Rev. 2012, 64, 4.
- 17. Elder, D.; Holm, R. Int. J. Pharm. 2013, 453, 3.
- 18. Van Drie, J. H. Internet Electron. J. Mol. Des. 2007, 6(9), 271.
- Ernst, B.; Magnani, J. L. Nat. Rev. Drug Discov. 2009, 661. http://dx.doi.org/ 19. 10.1038/nrd2852.
- 20. Witczak, Z. J. Curr. Med. Chem. 1995, 1, 392.
- 21. Carbohydrates in Drug Design; Witczak, Z. J., Nieforth, K., Eds.; Marcel Dekker: New York, 1997.

- 22. Carbohydrate-based Drug Discovery; Wong, C.-H., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2003.
- Carbohydrate Drug Design, Klyosov A. A, Witczak Z.J. Platt D. Eds. ACS symposium 23. series, 932, Oxford University Press, 2006.
- Click-Chemistry in Glycoscience New Development and Application; Witczak, Z. J., 24. Bielski, R., Eds.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, 2013.
- Belkaria, A.; Currie, J.-C.; Desgagnes, J.; Annabi, B. Cancer Cells Int. 2006, 6, 7.
 Siebert, J. W.; Cory, A. H.; Cory, J. G. Chem. Commun. 2002, 154.
- 27. Rayan, M.; Smith, M. P.; Vinod, T. K.; Lau, W. L.; Keana, J. F. W.; Griffith, O. H. J. Med. Chem. 1996, 39, 4366.
- Tian, Z.; Yang, M.; Huang, F.; Li, K.; Si, J.; Shi, L.; Chen, S.; Xiao, P. Cancer Lett. 28. 2005, 226, 65.
- 29. An Absorbance-based Cytotoxicity Assay using High Absorptivity, Water-soluble Tetrazolium Salts-Cell Quantitation Using WST-8 and the Synergy™ Mx, Held. P. BioTek Instruments, Highland Park, Winooski, Vermont, 2009.

Joanna Sarnik¹

Anna Czubatka-Bieńkowska¹

Jarosław Dziadek²

Zbigniew J. Witczak³

Tomasz Popławski^{1,⊠}

¹Katedra Genetyki Molekularnej, Wydział BiologiiiOchronyŚrodowiska, UniwersytetŁódzki ²Pracownia Genetyki i Fizjologii Mycobacterium, Instytut Biologii Medycznej PAN, Łódź ³Department of Pharmaceutical Sciences, Nesbitt School of Pharmacy, Wilkes University, Wilkes-Barre, USA

[™]Katedra Genetyki Molekularnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź; tel.: (42) 635 44 86, e-mail: tomasz.poplawski@ biol.uni.lodz.pl

Artykuł otrzymano 12 kwietnia 2016 r. Artykuł zaakceptowano 7 lipca 2016 r.

Słowa kluczowe: tiocukry, pochodne węglowodanów

Wykaz skrótów: FDA (ang. Food and Drug Administration) – Agencja Żywności i Leków; MGAM – α -glukozydaza; SI – α -dekstrynaza

Podziękowania: Praca finansowana przez Narodowe Centrum Nauki: UMO-2014/15/B/ NZ7/01002, DEC-2011/01/B/NZ4/03391, UMO-2014/15/N/NZ7/02948.

STRESZCZENIE

Tiocukry są analogami węglowodanów, w których jeden lub kilka atomów tlenu zostały zastąpione siarką. Atom siarki obecny w strukturze furanu lub piranu zmienia właściwości biologiczne węglowodanów, w porównaniu z ich zwierającymi atom tlenu odpowiednikami. Tiocukry są między innymi efektywnymi inhibitorami różnych komórkowych szlaków enzymatycznych i mają duży potencjał terapeutyczny, są wykorzystywane jako leki w leczeniu cukrzycy oraz chorób infekcyjnych. Ostatnio prowadzone są również badania sugerujące wykorzystanie tiocukrów jako leków w innych stanach patologicznych człowieka w tym do leczenia nowotworów. Badania te zmierzają w kierunku opracowania metod syntezy nowych tiocukrów, udoskonalenia obecnych poprzez stabilizację wiązań siarkowych oraz analizy *in vitro* i *in vivo* ich potencjalnych właściwości terapeutycznych. Najnowsze badania podsumowane w tej pracy są pierwszymi i jedynymi doniesieniami na temat tiocukrów i ich zastosowania w medycynie jakie dotąd ukazały się w polskiej literaturze naukowej.

WPROWADZENIE

Nowa era badań nad rolą węglowodanów w systemach biologicznych została rozpoczęta z chwilą identyfikacji rodziny białek rozpoznających i wiążących węglowodany (lektyn) [1]. Identyfikacja właściwości lektyn pozwoliła na opracowanie i rozwinięcie koncepcji kodu cukrowego (ang. *sugar code*) będącego odpowiednikiem kodu aminokwasowego dla białek czy też kodu genetycznego dla kwasów nukleinowych [2]. Było to zaskakujące, ponieważ do tej pory węglowodany postrzegano jako źródło energii oraz materiał budulcowy niemal wszystkich struktur komórkowych. Koncepcja kodu cukrowego została m. in. wykorzystana do opracowania nowych terapii, w których kluczową rolę pełnią węglowodany i ich pochodne. Do roku 2015 FDA (ang. *Food and Drug Administration*) zatwierdziła ponad 20 nowych leków będących pochodnymi węglowodanów używanych w leczeniu chorób infekcyjnych i chorób układowych człowieka (Tab. 1). Wśród nich są inhibitory α-glukozydazy, leki przeciwwirusowe, leki zapobiegające krzepnięciu krwi czy też stosowane w leczeniu anemii [3].

Rozwój tego kierunku badań z pogranicza biologii, chemii oraz medycyny był możliwy nie tylko dzięki zrozumieniu roli węglowodanów w systemach biologicznych, opracowaniu nowych metod ich syntezy oraz identyfikacji w systemach biologicznych potencjalnych celów dla nowo zsyntetyzowanych węglowodanów oraz ich pochodnych (ang. glyco targeting). Ten ostatni kierunek poszukiwań jest ściśle związany z rodziną białek będących receptorami błonowymi, lektynami oraz transporterami węglowodanów. Lektyny rozpoznają specyficznie węglowodany i ich pochodne, biorą udział w endocytozie stymulowanej przez oddziaływania ligand-receptor i występują w dużym zagęszczeniu w niektórych tkankach (np. od 50 0000 do 500 000 na powierzchni hepatocytów). Transportery węglowodanów uczestniczą w aktywnym transporcie wybranych węglowodanów, głównie monocukrów oraz ich deoksy analogów. Ich wysoka specyficzność w stosunku do transportowanych węglowodanów blokuje możliwość wykorzystania ich w planowaniu terapii węglowodanami i ich pochodnymi. Nie oznacza to, że transportery weglowodanów sa całkowicie bezużyteczne jako cel terapeutyczny, stosuje się tutaj koniugaty węglowodanów z innymi przedstawicielami grup związków organicznych. Węglowodany relatywnie łatwo wytwarzają koniugaty z tłuszczami oraz białkami tworząc glikoproteiny, proteoglikany, peptydoglikany, glikolipidy i lipopolisacharydy. Glikokoniugaty zawierają przeważnie siedem podstawowych monocukrów: D-glukozę, D-galaktozę, D-mannozę, D-ksylozę, L-fukozę i kwasy: D-glukuronowy oraz L-iduronowy. Osobną grupę tworzą glikokoniugaty zawierające trzy funkcjonalne aminocukry: N--acetyloglukozoaminę i N-acetylogalaktozoaminę i kwas sialowy.

Tabela 1. W	ybrane	przykłady	y leków na	bazie węglowo	danów i ich	pochodny	ych zatwierdzor	iych	przez FDA.
	/			E17					

Nazwa leku	Choroba	Mechanizm działania
Akarboza	cukrzyca	inhibitor α-glukozydazy
Miglitol	cukrzyca	inhibitor α-glukozydazy
Wogliboza	cukrzyca	inhibitor α-glukozydazy
Relenza	grypa – wirus typu A i B	hamuje aktywność enzymów wirusowych, neuraminidaz
Tamiflu	grypa – wirus typu A i B	hamuje aktywność enzymów wirusowych, neuraminidaz
Arixtra	działanie przeciwzakrzepowe	hamuje jeden z czynników uczestniczących w krzepnięciu krwi – czynnik Xa
Cerezyme	choroba Gauchera	jest analogiem enzymu ludzkiego β -glukocerebrozydazy
Topamax	epilepsja, profilaktyka migreny	dokładny mechanizm działania nieznany, posiada właściwość: blokowania napięciowo-zależnych kanałów sodowych; zwiększania aktywności neurotransmit- erów GABA na niektóre podjednostki receptora GABA-A; hamowania anhydrozy węglanowej

Łatwość z jaką weglowodany tworzą koniugaty oraz ulegają przekształceniom chemicznym znalazła zastosowanie w planowaniu nowych i ulepszaniu starych terapii. Powstałe w ten sposób leki charakteryzują się znacznie lepszymi parametrami farmakokinetycznymi i farmakodynamicznymi niż ich nie sprzężone z węglowodanami odpowiedniki. Modyfikacje takie nie tylko zwiekszaja zdolność leków do penetracji błon komórkowych, ale również modyfikują ich właściwości fizykochemiczne takie jak polarność, rozpuszczalność czy też stabilność w fizjologicznym pH. Dostępność i mnogość pochodnych węglowodanów tio-, deoksy-, nitro-, amino- wraz z ich poli-hydroksylowym charakterem stwarza możliwość wręcz dowolnego łączenia poszczególnych elementów na zasadzie zabawy z klockami. Przegląd literatury wskazuje, że jedną z ważniejszych grup węglowodanów mających olbrzymi potencjał terapeutyczny są węglowodany posiadające w pierścieniu heteroatom inny niż atom tlenu. Atom tlenu w pierścieniu cukrowym jest zastąpiony atomem azotu czy też siarki, co prowadzi do wyraźnych zmian fizykochemicznych właściwości zmodyfikowanego węglowodanu oraz pociąga za sobą zmianę właściwości biologicznych. Inne pierwiastki, które wprowadzano w te pozycje, takie jak fosfor lub selen, nie nadawały pochodnym węglowodanów interesujących z punktu widzenia chemii medycznej właściwości biologicznych. W konsekwencji siarkowe i azotowe pochodne węglowodanów inaczej niż ich tlenowe odpowiedniki reagują z komórkowymi enzymami modyfikującymi cukry, takimi jak glikozydazy czy glikozylotransferazy. Zmianie ulegają również interakcje z lektynami i transporterami węglowodanów m. in. pochodne węglowodanów posiadające atom azotu w pierścieniu węglowym są inhibitorami hydrolaz glikozydowych. Podobny efekt wykazano również dla węglowodanów mających w pierścieniu atom siarki. Grupę związków zawierających atom siarki w miejscu tlenu (jako heteroatom) nazywamy tiocukrami [3-7].

BUDOWA I WŁAŚCIWOŚCI TIOCUKRÓW

W układzie okresowym pierwiastków siarka usytuowana jest w tej samej grupie (drugiej) co tlen. Pomimo bliskiego podobieństwa zewnętrznych orbitali, siarka może występować w stanie utlenienia innym niż -2, a mianowicie +2, +4 oraz +6. Porównując atom tlenu i siarki ten pierwszy jest dużo mniejszy i znacznie bardziej elektroujemny.

Właściwości fizyczne i chemiczne pochodnych cukrów posiadających atom siarki, tiocukrów, różnią się od ich tlenowych analogów. Związki cukrowe zawierające atom siarki są bardziej stabilne. Wynika to ze zmniejszonej mutarotacji wykazywanej przez 5-tioaldozy w porównaniu z ich tlenowymi analogami. Ze względu na większą nukleofilowość siarki w porównaniu z tlenem, wielkość pierścienia tiocukru zależy od położenia grupy tiolowej w obrębie cząsteczki węglowodanu. Różnice w budowie wiążą się również z mniejszym kątem pomiędzy C-S-C niż pomiędzy C-O-C, dzięki czemu struktura tiocukru jest bardziej zakrzywiona.

Siarka w węglowodanach występuje przeważnie jako grupa tiolowa najczęściej w pozycji 1 oraz 5 monosacharydów oraz tworzy wiązanie glikozydowe w dwucukrach. Siarka decyduje również o strukturze cyklicznej formy tiocukrów. Tioheksozy przyjmują strukturę piranu oraz furanu w zależności od położenia grupy tiolowej (odpowiednio w pozycji C5 oraz C4) (Ryc. 1). Podobnie jak w przypadku tlenowych odpowiedników 5-tiocukry przyjmujące strukturę piranu są stabilniejsze od 4-tiocukrów występujących w formie furanozowej.



Rycina 1. Położenie grupy tiolowej decyduje o strukturze formy cyklicznej tiocukrów.



Rycina 2. Biologicznie aktywne związki organiczne występujące w naturze, zawierające atom siarki: mannostatyna (1), penicylina (2), biotyna (3), linkomycyna (4), sparsomycyna (5).

Różnice strukturalne pomiędzy tiocukrami a ich tlenowymi analogami nie są duże. Jest to przykład mimikry strukturalnej i do leksykonu biologicznego wprowadzono nowe pojęcie – gliko-mimikry [8,9].

Obecność siarki w związkach organicznych zmienia nie tylko ich właściwości chemiczne, ale również i biologiczne. Wyrazem tego jest duża różnorodność tej grupy związków występujących w naturze i posiadających aktywność biologiczną. Przykładami są: biotyna (3), penicylina (2), linkomycyna (4), sparsomycyna (5) czy też mannostatyna (1), która jest silnym inhibitorem mannozydazy wyizolowanym z *Streptoverticillium verticillus* (Ryc. 2) [3,10].

W grupie związków pochodzenia naturalnego warto wymienić tiocukry takie jak: 5-tio-D-mannoza (6), salacinol (7), neosalacinol (8), kotalanol (9), neokotalanol (10), tagetitoksyna (11), tiolaktomycyna (12) (Ryc. 3).

5-tio-D-mannoza zasługuje na wyróżnienie gdyż był to pierwszy odkryty naturalnie występujący 5-tiocukier. Związek ten został wyizolowany z gąbki morskiej *Clathria pyramida*. 5-tio-D-mannoza jest analogiem piranozy i posiada atom siarki w pierścieniu.

Innym przykładem tiocukrów występujących naturalnie są D-glukozynolany. Związki te są wtórnymi metabolitami roślinnymi. Ich bogatym źródłem są przedsta-



Rycina 3. Tiocukry pochodzenia naturalnego: 5-tio-D-mannoza (6), salacinol (7), neosalacinol (8), kotalanol (9), neokotalanol (10), tagetitoksyna (11), tiolaktomycyna (12), goitryna (13), sinigryna (14).

wiciele z rodzin Cruciferae, Capparidaceae i Ressedaceac. D-glukozynolany pośrednio odpowiadają za charakterystyczny smak i zapach roślin z rodziny Brassicaceae. Podczas rozpadu tkanek roślinnych D-glukozynolany są przekształcane w tiocyjaniany, izocjany i nitryle z udziałem mirozynazy. Szkielet D-glukozylanów jest zbudowany z tiocukru połaczonego z sulfonowanym weglem. Podstawnik R i grupa sulfonowa są w położeniu anti. Jako podstawnik R najczęściej występują pochodne aminokwasów, w związku z tym może on mieć charakter alifatyczny, aromatyczny lub heterocykliczny. Grupa sulfonowa decyduje o kwaśnym charakterze D-glukozynolanów, w roztworach wodnych występują one jako aniony. W zależności od grupy R zidentyfikowano około 80-100 naturalnych D-glukozynolanów. Typowym przedstawicielem tej grupy zwiazków jest goitryna (13) oraz sinigryna (14) występujące w nasionach gorczycy (Brassica nigra) (Ryc. 3).

D-glukozynolany są o tyle istotne, ponieważ zapoczątkowały badania dotyczące opracowania metod syntezy chemicznych tiocukrów. Rozwój tej gałezi chemii miał na celu zrozumienie mechanizmów działania tiocukrów, a po wykazaniu ich przydatności jako leków wzmocnienia ich potencjału terapeutycznego. Opracowano szereg metod chemicznych umożliwiających syntezę całego spektrum tiocukrów: pięcio-, sześcio- i siedmiowęglowych oraz ich pochodnych. Ich potencjał terapeutyczny jest różny. Najbardziej przydatną terapeutycznie grupą tiocukrów są sześciowęglowe tiocukry oraz ich pochodne, najmniej siedmiowęglowe. Pięciowęglowe tiocukry wykorzystywane jako leki to głównie pochodne nukleotydów. Tiocukry są stosowane jako leki w terapii cukrzycy typu 2, inwazyjnych chorób bakteryjnych, pasożytniczych, wirusowych oraz jako leki przeciwzakrzepowe. Tiocukry wykazują również potencjał przeciwnowotworowy. Należy tu jednak wspomnieć, że do tej pory nie została opracowana żadna terapia przeciwnowotworowa z użyciem tiocukrów, a doniesienia na temat ich właściwości przeciwnowotworowych mają charakter badań podstawowych [8,10-13].

TIOCUKRY JAKO LEKI STOSOWANE W TERAPII CUKRZYCY TYPU 2

Cukrzyca jest jedną z najpowszechniej występujących chorób metabolicznych o złożonej, niejednorodnej etiologii. Wyróżniamy cukrzycę typu 1 i typu 2. Cukrzyca typu 2 charakteryzuje się opornością na insulinę, a w późniejszych etapach niedoborem insuliny. W efekcie dochodzi do zahamowania transportu glukozy do wnętrza komórek i zaburzenia jej stężenia we krwi. Jednym z uznanych sposobów terapii cukrzycy typu 2 jest hamowanie działania hydrolaz glikozydowych. Są to enzymy z klasy hydrolaz, przecinające wiązanie glikozydowe, które jest jednym z najsilniejszych wiązań występujących w naturalnych polimerach. Hydrolazy glikozydowe są specyficzne względem rodzaju hydrolizowanych cukrów (np. glikozydazy, galaktozydazy) oraz określonego wiązania glikozydowego (np. α -1,4, α -1,6, β -1,4). Uczestniczą one między innymi w trawieniu węglowodanów dostarczanych organizmowi. U człowieka w ten proces zaangażowane



Rycina 4. Inhibitory stosowane do hamowania dwóch jelitowych hydrolaz glikozydowych w celu leczenia objawów cukrzycy typu 2. MGAM – α-glukozydaza zwana maltazą SI - α-dekstrynaza zwana izomaltazą, ct – katalityczna domena C-końcowa, nt – katalityczna domena N-końcowa. MGAM oraz SI są zakotwiczone w błonie komórkowej rąbka szczoteczkowego enterocytu. Domeny ct i nt posiadają aktywność α-1,4-egzohydrolitycznej glukozydazy. Dodatkowo ntSI posiada aktywność glikozydazy α-1,6 (substratem jest izomaltoza) natomiast ctSI glikozydazy α-1,2 (substratem jest sacharoza). Najskuteczniejsze inhibitory to: ntMGAM – analog de-O-sulfonowanego ponkoranolu, ctSI – 3'O-metyloponkoranol, ct MGAM – blintol czyli kongener salacinolu, ntSI - selenowy analog de-O--sulfonowanego ponkoranolu.

są głównie cztery enzymy: dwie a-amylazy występujące w ślinie oraz soku trzustkowym, oraz α-glukozydaza zwana również maltazą (MGAM) i α-dekstrynaza zwana izomaltazą (SI) wydzielane z sokiem jelitowym. Spośród tej czwórki enzymów dwa pierwsze hydrolizują złożone weglowodany do mniejszych cząsteczek, podczas gdy pozostałe rozkładają je na cukry proste, w tym glukozę. Regulacja aktywności MGAM oraz SI z wykorzystaniem odwracalnych inhibitorów glikozydaz pozostaje jednym z najefektywniejszych sposobów regulacji poziomu glukozy we krwi u osób z cukrzycą typu 2 (Ryc. 4). Mechanizm działania tych leków polega na hamowaniu aktywności tych enzymów poprzez zablokowanie ich N- i C--końcowych domen katalitycznych. W efekcie prowadzi to do spowolnienia wchłaniania cukrów prostych z jelita. Oprócz inhibitorów o charakterze cukrowym zawierających siarkę, warto wspomnieć tu o ich kongenerach zawierających w strukturze selen. Przykładem tej grupy związków jest blintol, selenowy analog salacinolu [14]

Innym takim przykładem leku będącego inhibitorem hydrolaz glikozydowych jest aminocukier akarboza (Ryc. 5) [15]. Akarboza jest silnym inhibitorem α -amylazy, a w mniejszym stopniu α -glukozydazy. Stosowanie jej u pacjentów powoduje wzdęcia oraz dolegliwości jelitowo-żołądkowe wywoływane fermentacją niestrawionych węglowodanów.



Rycina 5. Akarboza - inhibitor glikozydaz (15).

Większość inhibitorów hydrolaz glikozydowych stanowią węglowodany, w których jeden z atomów w pierścieniu został zamieniony. Przykładami takich zmian mogą być zastąpienie grupy acetylowej przez drugorzędową aminę lub wstawienie siarki. Inhibitory hydrolaz glikozydowych zawierają motyw cukrowy w postaci disacharydów, aminocukrów czy karbocyklicznych analogów monosacharydów zawierających atom węgla w pierścieniu zamiast atomu tlenu i tiocukrów.

Jedną z zalet tiocukrów (mono- i tio-di-sacharydów) w porównaniu do innych analogów węglowodanów są ich lepsze właściwości farmakokinetyczne i farmakodynamiczne po podaniu doustnym oraz brak charakterystycznych dla akarbozy objawów niepożądanych. Związane jest to z odwracalnym hamowaniem przez tiocukry głównie α-glukozydaz zamiast α-amylaz.

Mechanizm działania tiocukrów jako odwracalnych inhibitorów hydrolaz glikozydowych jest nadal słabo poznany. Związki te, oprócz bezpośredniego wiązania z hydrolazami glikozydowymi, modulują również transport weglowodanów przez ściane jelita. Modelowymi przedstawicielami tej grupy związków są naturalne tiocukry: salacinol i kotalanol. Salacinol to silny inhibitor a-glukozydazy wyizolowany z wodnych wyciągów korzeni i łodygi czterech gatunków roślin z rodzaju Salacia (Salacia chinensis, Salacia oblonga, Salacia prinoides i Salacia reticulata). Rośliny te są używane w medycynie tradycyjnej na Sri Lance i w Indiach do leczenia cukrzycy. Aktywność salacinolu jako inhibitora α-glukozydazy jest porównywalna do efektywności innego leku stosowanego w leczeniu cukrzycy, aminocukru akarbozy. Salacinol posiada unikalną strukturę zawierającą pierścień cukrowy z atomem siarki oraz dołączoną w łańcuchu bocznym grupę siarczynową. Kotalanol, tak jak salacinol, został wyizolowany po raz pierwszy również z tej samej rośliny Salacia reticulata. Posiada on te same właściwości biologiczne jak salacinol oraz zbliżoną budowę. Salacinol i kotalanol różnią się długością acyklicznego łańcucha polihydroksylowego. Salacinol zbudowany jest z łańcucha cztero-węglowego, natomiast kotalanol zawiera siedmio--weglowy łańcuch.

Kolejnymi przedstawicielami naturalnych tiocukrów występującymi w roślinach rodzaju *Salacia* są ponkoranol i salaprinol. Związki te zsyntetyzowano po raz pierwszy w laboratorium i do czasu ich identyfikacji i izolacji z *Salacia prinoides* zaliczano je do tiocukrów syntetycznych. Z roślin z rodzaju *Salacia* oprócz tiocukrów wyizolowano również ich de-O-sulfonowane odpowiedniki, które w nazwie posiadają przedrostek *neo*. Desulfonowe pochodne tiocukrów oraz C-5 diastereoizomery wykazują większą niż tiocukry aktywność jako inhibitory hydrolaz glikozydowych. Wskazuje się, że kluczową rolę odgrywa tu podstawnik przy atomie C-3 w łańcuchu bocznym.

Zastąpienie grupy siarczynowej łańcuchem alifatycznym w serii sztucznych pochodnych kotalanolu, salacinolu i ponkoranolu zwiększa hydrofobowość cząsteczki oraz oddziaływania z aminokwasami centrum aktywnego hydrolaz glikozydowych. Zwiększa to potencjał tych pochodnych naturalnych tiocukrów jako inhibitorów hydrolaz glikozydowych. Należy wspomnieć, że siarka jako heteroatom może być zastąpiona przez selen, co w niektórych przypadkach wzmacnia właściwości inhibitora [15-18].

Sukces kliniczny tych naturalnych tiocukrów zapoczątkował wzrost zainteresowania tiocukrami jako grupą związków potencjalnie przydatnych klinicznie. Przełożyło się to na opracowanie kilkunastu metod syntezy nowych syntetycznych tiocukrów posiadających odmienne od ich naturalnych odpowiedników właściwości biochemiczne [19]. Pierwszym syntetycznym tiocukrem o właściwościach inhibitora β -glikozydazy była 5-tio-D-ksylopiranoza [17], a następnie 5-tio-D-glukoza (16) (Ryc. 6).



Rycina 6. Przykłady inhibitorów β -glikozydazy: 5-tio-D-glukoza (16), 5-tio-D--ksylopiranoza (17).

Zastąpienie atomu tlenu siarką w D-glukozie zmieniło właściwości biologiczne glukozy nie zmieniając jej struktury przestrzennej. 5-tio-D-glukoza jako przykład mimikry glukozy zmieniała całkowicie metabolizm cukrów u szczurów, będąc przy tym nietoksyczna (wartość LD50 – 14 g/kg). U szczurów po podaniu tej mimikry Dglukozy zaobserwowano glikozurię, hiperglikemię oraz zmniejszenie ilości glikogenu w wątrobie wraz z upośledzeniem transportu glukozy przez błonę komórkową [20,21]. 5-tio-D-glukoza jest również słabym inhibitorem drożdżowej α -glikozydazy oraz β -glikozydazy z migdałów. Innymi przykładami inhibitorów hydrolaz glikozydowych z siarką w pierścieniu są: 1-deoksy pochodna tiomannozy i 5-tioglukopiranozyloamina.

TIOCUKRY JAKO LEKI PRZECIWBAKTERYJNE I PRZECIWWIRUSOWE

Pierwszą pochodną tiocukru o właściwościach przeciwbakteryjnych była wyizolowana ze *Streptomyces griseus* albomycyna (Ryc. 7) [18]. Albomycyna zaliczana jest do sideromycyn, związków które charakteryzuje kowalencyjne połączenia sideroforu z antybiotykiem, specyficznie rozpoznawanych przez receptory występujące w ścianie komórkowej bakterii gram-ujemnych i gram-dodatnich [22].



Albomycyna jest aktywna przeciwko bakteriom, które aktywnie transportuja żelazo do wnetrza komórki. Do tej grupy zaliczamy prawie wszystkie gatunki rodziny Enterobacteriaceae z wyjątkiem rodzajów Proteus i Morganella oraz niektóre patogenne gatunki gram-dodatnie: Staphylococcus ureus i Streptococcus pneumoniae. Oporność bakterii rodzajów Proteus i Morganella na albomycynę jest zwiazana z brakiem systemu aktywnego transportu żelaza. Wprowadzanie antybiotyku do komórki bakteryjnej z wykorzystaniem mechanizmu aktywnego transportu żelaza nazwano taktyka konia trojańskiego. Gdy patogen pobiera żelazo z takiego sideroforu, pobiera także antybiotyk, który go zabija. Albomycyna jako antybiotyk zawiera tiorybozyl pirymidyny, który hamuje działanie bakteryjnej syntetazy tRNA. Albomycyna służy również jako źródło 4'-tionukleozydów uzyskiwanych po jej enzymatycznej hydrolizie [23].

Kolejnym antybiotykiem będącym pochodną tiocukrów jest tiolaktomycyna. Został on wyizolowany z gatunku Nocardia sp., a następnie również zsyntetyzowany w laboratorium. Cechą charakterystyczną tiolaktomycyny oraz jej pochodnych jest obecność nienasyconego laktonu oraz siarki występującej jako heteroatom. Tiolaktomycyna w porównaniu z innymi tiocukrami charakteryzuje się zwiększoną lipofilnością. Cecha ta jest związana z brakiem w strukturze tego związku grup funkcyjnych oraz obecnością nienasyconego łańcucha pięcioweglowego występującego w pozycji C5 laktonu. Za właściwości biologiczne tiolaktomycyny oraz jej pochodnych odpowiedzialne jest ugrupowanie laktonu. Antybiotyk ten oraz jego pochodne wykazują szerokie spektrum działania obejmującym nie tylko drobnoustroje, ale też niektóre pasożyty i rośliny. Jako podstawowy mechanizm działania tej grupy antybiotyków przyjmuje się hamowanie enzymów należących do klasy FASII, odpowiedzialnych za syntezę kwasów tłuszczowych w bakteriach, pasożytach oraz roślinach. Tiolaktomycyna jest również inhibitorem baktervinych enzymów FabB, FabF oraz FabH, ponadto blokuje synteze kwasów mykolowych zarówno u pratków saprofitycznych Mycobacterium smegmatis jak i patogennych dla człowieka szczepów Mycobacterium tuberculosis. Modyfikacje tiolaktomycyny polegające na dodaniu

grup funkcyjnych w pozycji C-5 pierścienia laktonowego zwiększały antybakteryjny potencjał takich pochodnych. Wiąże się to ze ściślejszym przyleganiem antybiotyku do części aktywnej hamowanych przez niego enzymów. Kolejne analogi tiolaktomycyny zawierające alkaliczne grupy hydrofobowe w pozycji C3 i C5 hamują wzrost czynnika etiologicznego malarii: *Plasmodium falciparum* oraz innych patogennych dla człowieka pierwotniaków z rodzaju *Trypanosoma* [24,25].

Tagetitoksyna jest fitotoksyną produkowaną przez patogen roślinny *Pseudomonas syringae* pv. *Tagetis*. Związek ten jest inhibitorem chloroplastowej polimerazy RNA, co czyni z niego potencjalny herbicyd. Oprócz tego tagetitoksyna jest inhibitorem bakteryjnej polimerazy RNA *Escherichia coli* i *Thermus thermophilus* oraz hamuje aktywność eukariotycznej polimerazy III RNA. Mechanizm hamowania polega na stabilizacji kompleksu Polimeraza/RNA/DNA i spowolnieniu procesu dodawania kolejnych nukleotydów do nowo powstającej nici RNA, co w rezultacie prowadzi do zatrzymania syntezy RNA. Tagetitoksyna nie działa na pozostałe eukariotyczne polimerazy RNA, również jej celem nie są polimerazy RNA bakteriofagów T7 i SP6 [26,27].

Ostatnim przykładem tiocukrów i ich pochodnych wykazujących właściwości przeciwbakteryjne są tioanalogi trehalozy. Trehaloza jest disacharydem, w którym dwie cząsteczki glukozy są połączone elastycznym wiązaniem α -1,1-glikozydowym. Związek ten służy bakteriom jako źródło energii. Tioanalogi trehalozy blokują transport oraz wykorzystanie dwucukrów jako źródło energii przez bakterie i w efekcie spowalniają ich wzrost [28].

Obecność siarki w strukturze antybiotyku nie zawsze jest związana z jego podwyższonymi właściwościami antybakteryjnymi w porównaniu do tlenowych analogów, czego interesującym przykładem jest tiopochodna neaminy, zsyntetyzowana w 1979 roku przez kanadyjskich badaczy. Fragment neaminy jest aktywnym komponentem amino glukozydowych antybiotyków. Podczas gdy neamina charakteryzuje się minimalnym stężeniem hamującym (ang. *minimal inhibitory concentration*, MIC) 8 mg/mL, zaskakująco tioneamina jest biologicznie słabo aktywna i przy stężeniu 250 mg/mL nie powoduje zahamowania wzrostu *Staphylococus aureus*. Wynika stąd, że siarka jako element łączący obydwa biologicznie aktywne komponenty specyficznie obniża aktywność biologiczną tioneaminy [29].

Oprócz właściwości antybakteryjnych tiocukry mają również właściwości antywirusowe. Najbardziej spektakularnym tego przykładem jest ukierunkowana i racjonalna synteza tiosialozydów jako leków przeciwwirusowych [30]. Związki te zostały zsyntetyzowane zgodnie z koncepcją, według której tiosalozydy jako pochodne kwasu neuraminowego połączone z ugrupowaniem cukrowym za pomocą mostku siarczkowego są przykładem mimikry receptorów komórkowych wykorzystywanych przez wirusy podczas infekcji komórek eukariotycznych. Mechanizm działania przeciw wirusowego tiosalozydów jest związany z hamowaniem działania specyficznej wirusowej α-glukozydazy-neuraminidazy. Replikacja, między innymi wirusa grypy oraz jego infekcyjność zależy od aktywności tego enzymu. Neuroaminidaza umożliwia wirusom grypy opuszczenie komórek poprzez rozpad błony komórkowej zarażonej komórki. Enzym ten umożliwia także przyłaczenie wirusa do błony komórkowej, ponieważ neuroamidaza ma duże powinowactwo do kwasu sialowego receptorów błonowych. Hamowanie neuraminidazy nie eliminuje całkowicie infekcji wirusowej, ale cząstki wirusowe po zablokowaniu neuraminidazy tworzą agregaty lub pozostają związane z powierzchnią komórki zakażonej, co zapobiega rozprzestrzenieniu się wirusa i ułatwia eliminację wirusa komórkom układu odpornościowego [30]. Ta sama koncepcja została wykorzystana do hamowania infekcji innych wirusów należących do rotawirusów i wykorzystujących pochodne kwasu sialowego podczas infekcji [8].

Kolejną grupą pochodnych tiocukrów wykazujących właściwości przeciwwirusowe są tio-nukleozydy. Uzyskano wiele pochodnych tionukleozydów, które hamowały w testach *in vitro* namnażanie wirusów HIV, jednak okazywały się one, z jednym wyjątkiem, zbyt toksyczne dla człowieka i nie zostały dopuszczone jako leki [31]. Z grupy tych związków tylko tiopochodna L-cytydyny jest stosowana obecnie jako lek przeciwko wirusowi HIV [32]. Niewykluczone że dołączą do niej 4'tioarabinonukleozydy, które wykazują bardzo wysoką aktywność przeciwwirusową dla wirusów cytomegalii oraz herpeswirusów [33].

TIOCUKRY JAKO LEKI PRZECIWZAKRZEPOWE

W roku 1995 zespół kierowany przez Kuszmanna opracował metodę syntezy 6-deoksy-5-tio-D-glukozy. Umożliwiło to syntezę 4-cjanofenylo 1,5-ditio-D-ksylopiranozy. Związek ten jest znany jako Beciparcil (Ryc. 8) [19] i jest używany jako środek zapobiegający krzepnięciu krwi. Na bazie Beciparcilu powstało kilka jego pochodnych o zbliżonych do związku wyjściowego właściwościach biologicznych [34].



Rycina 8. Beciparcil (19).

TIOCUKRY JAKO POTENCJALNE LEKI PRZECIWNOWOTWOROWE

Badania nad biologicznymi właściwościami tiocukrów koncentrowały się również na próbach wykorzystania tej grupy związków do leczenia nowotworów. Badania te w przeciwieństwie do przedstawionych powyżej zastosowań praktycznych tiocukrów jako leków, nigdy nie wyszły poza obszar badań *in vitro* przeprowadzanych na nowotworowych liniach komórkowych. 5-tio-D-glukoza obniża przeżywalność komórek nowotworowych w hodowli prowadzonej w warunkach hipoksji. Efekt ten tłumaczy się zablokowaniem transportu glukozy do wnętrza komórki i jej "zagłodzeniem" [35]. Nasz zespół potwierdził te doniesienia, ponadto wykazaliśmy, że nie tylko 5-tio-D-glukoza, ale również i inny monotiosacharyd zawierający siarkę, 5-tio-D-fruktoza (Ryc. 9) [20] obniża przeżywalność komórek różnych linii nowotworowych: hormono-zależnych MCF-7 (rak sutka) i HeLa (rak szyjki macicy) oraz hormono-niezależnych LoVo (rak jelita grubego), A549 (rak płuc) i linii komórek białaczki szpikowej (K562). Jednak najbardziej obiecująca grupą tiocukrów o potencjale przeciwnowotworowym okazały się 1,4-tio-di-sacharydy (Ryc. 9). Zbudowane są one z dwóch monosacharydów połączonych mostkiem siarczkowym będącym mimikra wiązania glikozydowego. Najsilniejszy efekt cytotoksyczny zaobserwowaliśmy dla 1,4-tio-di-sacharydu, który ma grupy hydroksylowe w pierścieniu cukru zablokowane grupami acetylowymi. Obecność grup acetylowych zwiększa lipofilność takiej cząsteczki, co prawdopodobnie w konsekwencji zwiększa stężenie wewnątrzkomórkowe tego tiocukru. Obecnie trwają badania mające ustalić mechanizm działania przeciwnowotworowego tych związków oraz drogi ich transportu do wnętrza komórki nowotworowej [36,37]



Rycina 9. 5-tio-D-fruktoza (20), 1,4-tiodisacharyd (21).

Inny zespół pracował nad oceną właściwości przeciwnowotworowych kompleksu złożonego z chlorku złota połączonego z tiocukrem tio-β-D-glukozą. Związek ten hamował, w zakresie stężeń mikromolowych, rozwój linii komórkowej glejaka o dwa rzędy wielkości silniej niż karmustyna, lek obecnie stosowany w terapii glejaków. Dołączenie do kompleksu tiocukru zmieniło rozpuszczalność i tym samym biodostępność tego związku. Leczenie szczurów z glejakami złośliwymi tym nowym związkiem było dobrze tolerowane i doprowadziło do drastycznego spadku wzrostu guza. Lek silnie hamował reduktaze glutationu i tioredoksyny, jednak nie zaobserwowano zakłócania równowagi redoks w komórce. Najprawdopodobniej właściwości antyproliferacyjne tego związku wynikają ze zdolności do hamowania aktywności topoizomerazy I [38].

Innym przedstawicielem tiocukrów o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych są oligo- β -(1 \rightarrow 3)-tioglukany. Związki te hamują *in vitro* proliferację komórek nowotworowych jelita grubego, zmniejszają ekspresję onkogenów w komórkach nowotworowych oraz *in vivo* pobudzają system odpornościowy organizmu zwiększając, m. in. proces fagocytozy. Należy wspomnieć, że ten ostatni efekt jest cechą wspólną oligoglukanów, ale wprowadzenie wiązania siarkowego do oligoglukanów stabilizuje ich siarkowe pochodne i tym samym wydłuża czas ich działania w organizmie jako immunostymulatorów co najmniej trzykrotnie [39].

Postępy w opracowaniu nowych metod wprowadzania atomu siarki w strukturę piranu i furanu umożliwiły synteze nowych siarkowych analogów weglowodanów z obiecującymi właściwościami terapeutycznymi. Do dwóch najważniejszych metod zalicza się metodę opracowaną przez nasz zespół, polegającą na stereo selektywnej koniugacji tioli ze sprzężonym układem cukrowym (ang. tio-click) i prowadzącą do dwucukrów połączonych mostkiem siarkowym [40] oraz metodę Scanlana polegającą na reakcji cyklizacji tio-piranów z wykorzystaniem rodników [41-44]. Metody te umożliwiają między innymi dołączanie do szkieletu cukrowego nowych grup funkcyjnych. Grupy te reprezentują różne kategorie aglikonów np.: izoksazole, adamantany, struktury pierścieniowe na bazie benzoesanu etc. i spełniają role farmakoforów zwiekszajacych właściwości farmakologiczne siarkowych analogów węglowodanów. W przeciwieństwie do tiocukrów syntetycznych zaskakująco mało wiadomo na temat dróg biosyntezy tiocukrów naturalnych. Nie ma żadnych danych na temat szlaku biosyntezy 5-tio-D-glukozy. Do tej pory nie zidentyfikowano żadnego genu kodującego białka zaangażowane w syntezę tego tiocukru. Podobna sytuacja jest w przypadku procesu biosyntezy albomycyny. Wykorzystując metody genomiki porównawczej zidentyfikowano co prawda in silico w genomie S. griseus cluster genowy odpowiedzialny prawdopodobnie za biosyntezę albomycyny. Bez dowodów doświadczalnych doniesienie to pozostaje tylko hipotezą. Tym samym zaproponowany przez autorów model biosyntezy wykorzystujący reakcję wolnorodnikową oczekuje weryfikacji [45]. Nic nie wiadomo na temat biosyntezy salacinolu, kotalanolu i ponkoranolu. Sugeruje się, że atom siarki wraz z przyległymi atomami węgla pochodzi od metioniny, aczkolwiek ta hipoteza również oczekuje weryfikacji. Stosunkowo najwięcej wiadomo na temat biosyntezy glukozynolanów, jednak i tutaj pozostaje do rozstrzygnięcia kwestia pochodzenia atomu siarki obecnego w tej klasie związków. Jako źródło siarki wskazywany jest tutaj glutation albo metionina [46].

Biorąc pod uwagę mnogość obecnie wykorzystywanych farmakoforów do produkcji leków, nieograniczone wręcz możliwości wstawiania ich do siarkowych pochodnych węglowodanów oraz obecne zastosowanie tiocukrów do leczenie szerokiej gamy patologii człowieka, przyszłość chemii medycznej może należeć do tiocukrów. Drugi kierunek badań związany z tiocukrami dotyczy nie tyle syntezy nowych, obiecujących pod względem zastosowań w medycynie tiocukrów, a raczej opisania szlaków biochemicznych biosyntezy tiocukrów naturalnych wraz z określeniem komponentów genetycznych i białkowych biorących udział w tych procesach.

PIŚMIENNICTWO

- 1. Reina Jose J, Bernardi A (2012) Carbohydrate mimics and lectins: a source of new drugs and therapeutic opportunities. Mini Rev Med Chem 12: 1434-1442
- 2. Gabius, HJ (2009) The sugar code fundamental of glycosciences. Wiley-VCH, Weinheim

- 3. Witczak ZJ (2007) New strategies and targets in the development of carbohydrate therapeutics. Chem Today 25: 92-97
- Beat E, Magnanu JL (2009) From carbohydrate leads to glycomimetic drugs. Nat Rev Drug Discov 8: 661-677
- 5. Byun HS, Bittman R (1995) A short synthesis of antitumor ether thioglycolipids: thioglycosidation of glucose donor with a tribu-tylstannyl sulfide acceptor. Tetrahedron Lett 36: 5143-5146
- 6. Yuasa H, Izumi M, Hashimoto H (2009) Thiasguars: potential glycosidase inhibitors. Curr Top Med Chem 9: 76-86
- Moreno-Vargas AJ, Molina L, Carmona AT, Ferrali A, Lambelet M, Spertini O, Robina I (2008) Synthesis and biological evaluation of s-neufucopeptides as E- and P-selectin inhibitors. European J Org Chem 2008: 2973-2982
- 8. Witczak ZJ (1999) Thio Sugars: Biological relevance as potential new therapeutics. Curr Med Chem 6: 165-178
- 9. Fernandez-Bolanos JG, al-Masoudi NAL, Maya I (2001) Sugar derivatives having sulfur in the ring. Adv Carbohydr Chem Biochem 57: 21-98
- 10. Aoyagi T, Yamamoto T, Kojiri K, Morishima H, Nagai M, Hamada M, Takeuchi T, Umezawa H (1989) Mannostatins A and B: new inhibitors of alpha-D-mannosidase, produced by *Streptoverticillium verticillus* var. quintum ME3-AG3: taxonomy, production, isolation, physico-chemical properties and biological activities. J Antibiot 42: 883-889.
- 11. Witczak ZJ, Culhane JM (2005) Thiosugars: new perspectives regarding availability and potential biochemical and medical applications. Appl Microbiol Biotechnol 69: 237-244
- 12.Sivapriya K, Chandrasekaran S (2006) New conformationally locked thioderivatives of mannose: synthesis, applications, and mechanistic studies. Carbohydr Res 341: 2204-2210
- 13. Comber RN, Friedrich JD, Dunshee DA, Petty AL, Secrist JA III (1994) α -(1 \rightarrow 2)-, α -(1 \rightarrow 3)-, and α -(1 \rightarrow 6)-linked thioglycosidic disaccharides: synthesis and anti-HIV testing of thiokojibioseoctaacetate, thionigerose, and thioisomaltose. Carbohydr Res 262: 245-255
- 14. Mohan S, Eskandari R, Pinto BM (2014) Naturally occurring sulfonium-ion glucosidase inhibitors and their derivatives: A promising class of potential antidiabetic agents. Acc Chem Res 47: 211-225
- 15. Mohan S, Pinto BM (2010) Towards the elusive structure of kotalanol, a naturally occurring glucosidase inhibitor. Nat Prod Rep 27: 481-488
- 16. Tanabe G, Sakano M, Minematsu T, Matusda H, Yoshikawa M, Muraoka O (2008) Synthesis and elucidation of absolute stereochemistry of salaprinol, another thiosugar sulfonium sulfate from the ayurvedic traditional medicine *Salacia prinoides*. Tetrahedron 64: 10080-10086
- 17. Aguirre-Valderrama A, Dobado JA (2006) Conformational analysis of Thiosugars: Theoretical NMR chemical shifts and $^3J_{\rm H,H}$ coupling constants of 5-thio-pyranose monoaccharides. J Carbohyd Chem 25: 557-594
- 18. Uhrig ML, Manzano VE, Varela O (2006) Stereoselective synthesis of 3-Deoxy-4-S-(1 \rightarrow 4)-thiodisaccharides and their inhibitory activities towards β -glycoside hydrolases. Eur J Org Chem 2006: 162-168
- 19. Liu D, He W, Wang Z, Liu L, Wang C, Zhang Z, Wang C, Wang Y, Tanabe G, Muraoka O, Wu X, Wu L, Xie W (2016) Design, synthesis and biological evaluation of 3'-benzylated analogs of 3'-epi-neoponkoranol as potent α -glucosidase inhibitors. Eur J Med Chem 110: 224-236
- 20. Hoffman DJ, Whistler RL (1968) Diabetogenic action of 5-thio-D--glucopyranose in rats. Biochemistry 7: 4479-4483
- 21. Whistler RL, Lake WC (1972) Inhibition of cellular transport process by 5-thio-D-glucopyranose. Biochem J 130: 919-925
- 22. Zeng Y, Roy H, Patil PB, Ibba M, Chen S (2009) Characterization of two seryl-tRNA synthetases in albomycin-producing *Strepto*-

myces sp. strain ATCC 700974. Antimicrob Agents Chemother 53: 4619-4627

- 23. Pramanik A, Stroeher UH, Krejci J, Standish AJ, Bohn E, Paton JC, Autenrieth IB, Braun V (2007) Albomycin is an effective antibiotic, as exemplified with *Yersinia enterocolitica* and *Streptococcus pneumoniae*. Int J Med Microbiol 297: 459-469
- 24. Kremer L, Douglas JD, Baulard AR, Morehouse C, Guy MR, Alland D, Dover LG, Lakey JH, Jacobs WR Jr, Brennan PJ, Minnikin DE, Besra GS (2000) Thiolactomycin and related analogues as novel anti-mycobacterial agents targeting KasA and KasB condensing enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*. J Bio Chem 275: 16857-16864
- 25. Xavier NM, Madeira PJA, Florencio MH, Rauter AP (2009) Synthetic approaches to novel thiosugar scaffolds containing α , β -unsaturated carbonyl groups. European J Org Chem 2009: 4983-4991
- 26. Yuzenkova Y, Roghanian M, Bochkareva A, Zenkin N (2013) Tagetoxin inhibits transcription by stabilizing pre-translocated state of the elongation complex. Nucleic Acids Res 41: 9257-9265
- Steinberg TH, Mathews DE, Durbin RD, Burgess RR (1990) Tagetoxin: new inhibitor of eukaryotic transcritption by RNA polymerase III. J Biol Chem 265: 499-505
- 28. Morais GR, Humphrey AJ, Falconer RA (2009) A facile preparation of trehalose analogues: 1,1-thiodisaccharides. Carbohydr Res 344: 1039-1045
- 29. Kavadias G, Droghini R, Pepin Y, Menard M, Lapointe P (1978) Synthesis of a thioanalogue of neamne. The reaction of nitrosochloroadducts of glycols with thiols. Can J Chem 57: 1056-1063
- 30. Levy DE, Fugedi P (2005) The organic chemistry of sugars. CRC Press, Tylor & Francis Group, Boca Raton
- 31. Grynkiewicz G, Szeja W, Boryski J (2008) Synthetic analogs of natural glycosidases in drug discovery and development. Acta Pol Pharm Res 65: 655-676
- 32. Beach JW, Jeong LS, Alves AJ, Pohl D, Kim HO, Chang C-N, Doong S-L, Schinazi RF, Cheng, Y-C, Chu CK (1992) Synthesis of enantiomerically pure (20R,50(S)-(-)-1-[2-(hydroxymethyl) oxathiolan-5-yl]cytosine as a potential antiviral agent against hepatitis B virus (HBV) and human immunodefficiency virus (HIV). J Org Chem 57: 2217-2219
- 33. Steiner A, Stutz A, Wrodnigg T (2008) Sulfur-containing glycomymtics W: Fraser-Reid BO (red) Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology. Springer-Verlag, Berlin str. 1999-2020
- 34. Bozó E, Boros S, Kuszmann J (1997) Synthesis of 4-cyanophenyl 1,5-dithio-beta-D-glucopyranoside and its 6-deoxy, as well as 6-deoxy-5-ene derivatives as oral antithrombotic agents. Carbohydr Res 304: 271-280
- 35. Bushway AA, Whistler RL (1975) Repression of cancer cell growth by 5-thio-D-glucose. J Carbohydrates Nucleosides Nucleotides 2: 399-405
- 36. Witczak ZJ, Poplawski T, Czubatka A, Sarnik J, Tokarz P, Van-Wert AL, Bielski R (2014) A potential CARB-pharmacophore for antineoplastic activity: Part 1. Bioorg Med Chem Lett 24: 1752-1757
- 37. Witczak ZJ, Sarnik J, Czubatka A, Forma E, Poplawski T (2014) Thio-sugar motif of functional CARB-pharmacophore for antineoplastic activity. Part 2. Bioorg Med Chem Lett 24: 5606-5611
- 38. Jortzik E, Farhadi M, Ahmadi R, Tóthc K, Lohr J, Helmke BM, Kehr S, Unterbergb A, Ott I, Gust R, Deborde V, Davioud-Charvet E, Réaui R, Becker K, Herold-Mende C (2014) Antiglioma activity of GoPI-sugar, a novel gold(I)-phospholeinhibitor: Chemical synthesis, mechanistic studies, and effectiveness *in vivo*. Biochim Biophys Acta 1844: 1415-1426
- 39. Sylla B, Legentil L, Saraswat-Ohri S, Vashishta A, Daniellou R, Wang HW, Vetvicka V, Ferrieres V (2014) Oligo-beta-(1→3)glucans: Impact of thio-bridges on immunostimulating activities and the development of cancer stem cells. J Med Chem 57: 8280-8292

- 40. Witczak ZJ, Lorchak D, Nquyen N (2007) A click chemistry approach to glycomimetics: Michael addition of 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio-beta-D-glucopyranose to 4-deoxy-1,2-O-isopropylidene-L-glycero-pent-4-enopyranos-3-ulose--a convenient route to novel 4-deoxy-(1->5)-5-C-thiodisaccharides. Carbohydr Res 342: 1929-1933
- 41. Malone A, Scanlan EM (2013) Application of thiyl radical cyclizations for the synthesis of thiosugars. Org Lett 15: 504-507
- 42.Scalan EM, Corce V, Malone A (2014) Synthetic appications of intramolecular thiol-ene "click" reactions. Molecules 19: 19137-19151
- 43. Malone A, Scalan EM (2013) Applications of 5-exo-trig thiyl radical cyclizations for the synthesis of thiosugars. J Org Chem 78: 10917-10930

- 44. Corce V, McSweeney L, Malone A, Scalan EM (2015) Intramolecular thiol-yne cyclisation as novel strategy for thioglycan synthesis. Chem Commun 51: 8672-8674
- 45. Hosted TJ, Wang TX, Alexander DC, Horan AC (2001) Characterization of the biosynthetic gene cluster for the oligosaccharide antibiotic, Evernimicin, in *Micromonospora carbonacea* var. *africana* ATCC39149. J Ind Microbiol Biotechnol 27: 386-392
- 46. Lewis C, Clapp HW, Grady JE (1963) In vitro and in vivo evaluation of lincomycin, new antibiotic. Antimicrob Agents Chemother 1963: 570-582

Thiosugars used as drugs

Joanna Sarnik¹, Anna Czubatka-Bieńkowska¹, Jarosław Dziadek², Zbigniew J. Witczak³, Tomasz Popławski^{1,⊠}

¹Department of Molecular Genetics, University of Lodz, Lodz, 141/143 Pomorska St., 90-236 Lodz, Poland

²Mycobacterium Genetics and Physiology Unit, Institute of Medical Biology, Polish Academy of Sciences, 106 Lodowa St., 93-232 Lodz, Poland

³Department of Pharmaceutical Sciences, Nesbitt School of Pharmacy, Wilkes University, 84 West South St., Wilkes-Barre, PA 18766, USA

[™]e-mail: tomasz.poplawski@biol.uni.lodz.pl

Key words: thiosugars, carbohydrate derivatives

ABSTRACT

Thiosugars are carbohydrate analogs in which one or few of the oxygen atoms were replaced by sulfur. The sulfur atom which is present in the furan and pyran structures, changes biological properties of carbohydrates, as compared to their oxygen analogs. Among others, thiosugars are effective inhibitors of various cellular and enzymatic pathways and also have great therapeutic potential. They are used as a drugs in diabetes and infectious diseases treatment. Recent evidence suggests that these compounds may have therapeutic properties and be also used in the treatment of some pathological conditions, including cancer diseases. This research are aimed towards the development and improvement of the current methods of synthesis of new thiosugars through stabilization of sulfur bonds and *in vitro* and *in vivo* analysis of their potential therapeutic properties. In this work the summary of the latest reports about thiosugars and their application in the medicine is presented for the first time in the Polish language literature.

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 27 (2017) 1215-1219

Contents lists available at ScienceDirect



Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl

The induction of oxidative stress in cervix carcinoma cells by levoglucosenone derived 4-S-salicyl derivative and (1–4)-S-thio-disaccharides. Part 4



Joanna Sarnik^a, Anna Czubatka-Bienkowska^a, Anna Macieja^a, Roman Bielski^b, Zbigniew J. Witczak^{b,*}, Tomasz Poplawski^a

^a Department of Molecular Genetics, University of Lodz, Lodz 90-236, Poland ^b Department of Pharmaceutical Sciences, Nesbitt School of Pharmacy, Wilkes University, 84 W. South Street, Wilkes-Barre, USA

ARTICLE INFO

Article history: Received 28 November 2016 Revised 18 January 2017 Accepted 19 January 2017 Available online 22 January 2017

Keywords: Functional CARB-pharmacophore (1–4)-S-thiodisaccharides Oxidative stress DNA damage Reactive oxygen species

ABSTRACT

(1-4)-S-thiodisaccharides were shown to kill various cancer cell lines, including cervix, lung, mammarygland and colon by unknown mechanisms. Here we identified two actions of levoglucosenone derived (1-4)-S-thiodisaccharides against cervix cancer cells: induction of oxidative stress and DNA damage. In consequence, (1-4)-S-thiodisaccharides lowered the cellular GSH level and changed the expression profile of genes encoding key proteins involved with oxidative stress response. We also observed that (1-4)-Sthiodisaccharides induced DNA damage and interfered with the thioredoxin (Trx) system. Both actions, as induced by FPC6, were stronger when dihedral angles of sulfur bridge were set to 110° , 100° and 109° , clearly indicating differences when compared to FPC8. These findings demonstrate that the 1-4thio bridge of disaccharide is a powerful anticancer pharmacophore, and its potential use needs further studies.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Sugars with heteroatoms other than oxygen have attained considerable importance in glycobiology and in drug design.¹ The oxygen could be replaced by sulfur, nitrogen, selenium or phosphorus forming thio sugars, imino sugars, seleno sugars, as well as, phospho sugars. There are also examples of sugar derivatives known as carbasugars and inositols - they have the ring oxygen atom replaced by a carbon atom. Articles on thio sugars and imino sugars^{2,3} have dominated the scientific literature describing carbohydrates containing heteroatoms. Reports on other sugars analogs (with heteroatoms other than sulfur and nitrogen) are relatively rare. It is because these two sugar analogs (in particular thio sugars) exhibit important biological activities and offer a great therapeutic potential. Nowadays, thio sugars are used in treatment of diabetes and some bacterial and viral infection diseases.⁴ The therapeutic potential of thio sugars results from the fact that the presence of a sulfur atom changes the information content of sugar analogs; and, therefore, thio sugars are not recognized by cellular carbohydrate-recognizing biological entities like glycosidases, phosphorylases or glycosyltransferases. Surprisingly, to date, there are only a few reports (including our reports) regarding thio sugars

* Corresponding author. *E-mail address: zbigniew.witczak@wilkes.edu* (Z.J. Witczak). ability to impede cancer cells growth. Moreover, the reports focused only on observations of the effects of thio sugars on cancer cell-line viability.^{5–11} These studies showed that functionalized thio sugars have cytotoxic properties and a potential as anticancer agents. However, the mechanisms of their action remain unknown.

Herein, we report for the first time the mechanism of cytotoxicity of thio sugars containing a sulfur atom as a thio bridge. All tested compounds labeled as FCP 6–9 were synthetized in our laboratory, employing the thio-click method⁷ and are presented on Scheme 1. Formally, (with the exception of FPC 8) they are (1–4)-S-thiodisaccharides. Three of them (FCP6, 7 and 9) have two sugar moieties linked by a sulfur bridge; whereas, the last one (FCP8) has the aromatic moiety with protruding –COOH motif. We used such set of compounds to test potential influence of the carbohydrate moiety on anticancer properties.

As we previously reported⁷, it is important to mention that the bond angles of FCP 6, 7, and 9 differ from that of FCP8. Compounds with two sugar moieties have similar, comparable bond angles of 1–4-thio-bridge; whereas, FCP8 has more disperse (110°, 100° and 109° vs 126°, 97° and 113°). FCP7 has unblocked 2, 3, 4, and 6 carbon atoms with —OH groups – these positions in FCP6 and FCP9 are blocked by acetyl moieties. FCP6 has a glucose moiety; whereas, FCP9 has galactose.



Scheme 1. Levoglucosenone derived FCP6-9 as functionalized (1–4)-S-thiodisaccharides.

As we discussed earlier⁷ all compounds are more likely to be membrane permeable and easily absorbed by the body as they fit the Lipinski criteria. Also, in our previous report we showed that most potent compound was FCP6.⁷ It was clearly a surprise as we expected that FCP7 to be a more active compound due to the presence of 4–OH groups. Since, one of the most sensitive cancer cell line is HeLa, we decided to use HeLa cells to evaluate the mechanism of the (1-4)-S-thiodisaccharides action. We have applied FCPs in concentrations based on the results obtained in a previous work,⁷ where the cytotoxicity and apoptosis assays were performed. We observed the concentration dependent genotoxic effect in HeLa cells incubated with FCPs for 1 h as seen in the comet assay (Fig. 1). The comet assay or single cell gel electrophoresis (SCGE) assay is a rapid, sensitive and relatively



Fig. 1. The DNA damage induced by FCP 6–9 in HeLa cells. The genotoxicity was analyzed after 1 h incubation in 37 °C with FCPs. The DNA damage was measured as the DNA percentage in the tail in alkaline (black bars), pH 12.1 (grey bars) and neutral (white bars) comet assay. All experiments included positive (20μ M hydrogen peroxide) and negative control (untreated cells). DNA damage level in negative control didn't exceed 5% and reached $2 \pm 2\%$. DNA damage level in positive control reached $30 \pm 15\%$ depending on the version of comet assay. Data represent the mean ± SEM of quadruplicate.

simple method for detecting the DNA damage at the level of individual cells. $^{\rm 12}$

We used the comet assay under alkaline, at pH 12.1 and neutral conditions. With these three versions of the comet assay, it is possible to detect single DNA strand breaks, double DNA strand breaks, alkali-labile sites and incomplete excision repair sites. The approach allowed us to evaluate the participation of single and double strand breaks, alkali-labile sites in observed DNA lesions.¹² Summing up the results from the comet assay, it was observed that FCPs induced single strand breaks and alkali labile sites. FCPs have no effect on the formation of double strand breaks. The level of DNA damage determined by the version at pH 12.1 may indicate an incomplete excision repair. Single strand breaks could be the result of the DNA repair process of the DNA lesions induced by FCP or could be induced by FCPs directly or indirectly. We tested it using the in vitro plasmid relaxation assay (Supporting Materials). After incubation of FCPs with pUC19 plasmid DNA, the electrophoresis pattern of samples was similar to the control indicating that all tested FCPs did not evoke DNA breaks directly. We also analyzed the kinetics of the DNA repair in HeLa cell lines after a 1 h exposure to FCPs by measuring the level of the DNA damage in the cells after 0, 15, 30, 45, 60, and 120 min of repair after the damaging incubation (Supporting Materials). In all cases the cells were able to recover at least 90% of the damage after the exposition to FCPs. To determine if indirectly induced by FCPs DNA breaks are a result of the metabolic conversion/activation of FCPs, we utilized the kinetics of the DNA damage performed in 37 °C and 4 °C (Fig. 2). In all cases kinetic curves performed at 37 °C differ from those acquired at 4 °C, and the amount of DNA lesions is statistically lower when the cellular metabolism is slowed down by the low temperature. This data together with our previous report suggest that thio sugars could "produce" reactive



Fig. 3. Reduction of FCPs induced DNA damage (black bars) by antioxidants: Vitamin E (grey bars) and Epicatechin (dark grey bars). HeLa cells were preincubated with antioxidants prior to incubations with FCPs. Data were received from alkaline version of comet assay and represent the mean ± SEM of quadruplicate.



Fig. 2. The kinetics of the FCPs-induced DNA damage in HeLa cells. The percentage of DNA damage was analyzed after 0, 15, 30, 45 and 120 min of incubation in 37 °C and 4 °C with selected concentrations of FCPs. The concentration of the FCPs was chosen based on results of the alkaline version of the comet assay and introduced DNA lesions visible as 10–20% DNA in the comet tail. Data were received from the alkaline version of the comet assay and represent the mean ± SEM of quadruplicate.



Fig. 4. The level of reactive oxygen species (ROS) in HeLa cells after 1 h incubation with tested compounds in comparison to the untreated control. Tert-Butyl hydrogen peroxide (TBHP) was used as the positive control. The percentage of DCF fluorescence was analyzed after 30 min of preincubation with 10 μ M CM-H2DCFDA and 1 h incubation with FCPs. Data represent the mean ± SD of triplicate (*** p ≤ 0.001).

oxygen species (ROS). If so, the DNA damaging effect could be reversed by antioxidants.

Antioxidants inhibit oxidation reactions and can remove free radical intermediates,¹³ which may derive from the action of the FCPs. To verify this hypothesis we preincubated the HeLa cells with two known antioxidants: Vitamin E and Epicatechin prior to incubations with FCPs. Both antioxidants lowered the level of the DNA damage induced by FCPs (Fig. 3).

Next we decided to measure the cellular oxidative stress using two probes: 2',7'-dichlorofluorescin diacetate (CM-H2DCFDA) and diaminofluorescein diacetate (DAF-2 DA). Both are cell-permeable non-fluorescent probes that turn to highly fluorescent probes upon oxidation. The first one is activated by reactive oxygen species, whereas, the second is activated rather by nitric oxide.¹⁴ After incubations of HeLa cells with (1–4)-S-thiodisaccharides (FCP6, FCP7 and FCP9), we observed an increase in fluorescence of samples with CM-H2DCFDA (Fig. 4), but not with DAF-2 DA (Supporting Materials). This means that hydroxyl radicals are the main product of tested FCPs. We also observed higher fluorescence in samples incubated with FCP8 as compared with the control, but this difference was not statistically important.

We could conclude that FCP8 did not evoke the oxidative stress as all remaining compounds. The cell evolved mechanisms – collectively termed antioxidant defense system to maintain the intracellular redox homeostasis in response to the oxidative stress.

Upon the activation this system impacts a wide variety of cellular processes including the increase of the transcription of key proteins involved in the antioxidant defense system.¹⁵ Therefore, we analyzed the expression level of 13 genes in biological pathways activated in response to the oxidative stress: SOD1, SOD2, HMOX-1, GCLM, TXN, FHL2, NCOA7, NQO1, NOX4, NOX5, CAT, GPX1, GPX4. We found that some of them are upregulated in cells incubated with FCPs (Table 1).

The most affected genes were HMOX-1 and GLCM. HMOX-1 encoding hemeoxygenase 1(HO-1) and GCLM encoding gluta-mate-cysteine ligase modulatory subunit (GCLMS). Both proteins are known to be redox-linked cytoprotective factors.^{16–18}

HO-1 catalyzes the conversion of the intracellular heme into biliverdin, which is further reduced into a potent antioxidant bilirubin. GCLMS is a modulator subunit of GCL protein that plays a key role in the glutathione homeostasis. The expression of other key indicators/responders of oxidative stress^{19,20}: - SOD (superoxide dismutatase which converts superoxide into hydrogen peroxide), CAT (catalase which degrades organic peroxides) and GPX (glutathione peroxides which uses reduced glutathione and hydrogen peroxide to produce oxidized glutathione and water) were also slightly increased.

How do FCPs induce the oxidative stress? The regulation of the redox homeostasis is provided by glutathione (GSH), thioredoxin (Trx), and glutaredoxin (Grx) systems.²¹ When one is affected, others also do not work appropriately. Therefore, we checked the cellular GSH depletion in cells incubated with FCPs. All studied FCPs evoked GSH depletions as seen on Fig. 5.



Fig. 5. The bar graph shows the depletion of GSH that is reflected in the level of fluorescence of GSH-MBCL in tested samples after 1 h incubation with FCPs compared to the untreated control (100%). As the positive control 24 h incubation with L-Buthionine-sulfoximine (BSO) was used. Data represent the mean ± SD of triplicate (*** p ≤ 0.001).

Table 1

The level of the relative gene expression of genes involved in the oxidative stress and antioxidant defense. The increase (\uparrow) and decrease (\downarrow) in gene expression in cells treated with the compounds was determined relative to untreated cells (Control: 1.00). The GAPDH gene was the endogenous control of the experiment. Data represent the mean ± SD of six replicates (*** p \leq 0.001).

Gene/FCP	Control	FCP6		FCP7		FCP8		FCP9	
SOD1	1.00	1.18 ± SD	↑ (***)	1.16 ± SD	-	1.12 ± SD	-	1.07 ± SD	-
SOD2	1.00	$1.56 \pm SD$	↑ (*)	$1.25 \pm SD$	↑(*)	$1.28 \pm SD$	↑ (*)	$1.26 \pm SD$	↑(*)
HMOX	1.00	20.29 ± SD	↑ (*)	7.29 ± SD	↑ (**)	3.42 ± SD	↑ (**)	10.53 ± SD	↑ (**)
GCLM	1.00	2.21 ± SD	↑ (**)	1.95 ± SD	↑ (**)	1.56 ± SD	↑ (**)	1.77 ± SD	↑ (**)
TXN	1.00	0.76 ± SD	\downarrow (*)	0.94 ± SD	-	0.93 ± SD	-	1.07 ± SD	-
NCOA7	1.00	0.43 ± SD	\downarrow (***)	0.35 ± SD	↓ (***)	0.51 ± SD	\downarrow (***)	0.37 ± SD	\downarrow (***)
NQO1	1.00	1.34 ± SD	↑ (*)	1.27 ± SD	↑ (*)	1.61 ± SD	↑ (***)	1.36 ± SD	↑ (***)
NOX4	1.00	0.58 ± SD	\downarrow (***)	0.68 ± SD	\downarrow (***)	1.13 ± SD	-	0.74 ± SD	-
NOX5	1.00	0.53 ± SD	-	0.34 ± SD	-	0.56 ± SD	↓ (*)	0.68 ± SD	-
GPX4	1.00	1.15 ± SD	↑ (*)	0.56 ± SD	\downarrow (*)	0.56 ± SD	\downarrow (*)	0.75 ± SD	↓ (*)

Table 2

The level TrxR activity reduction in HeLa cells after 14 h incubation with IC50 of tested compounds in comparison to untreated control. Data represent the mean ± SD of three replicate (** $p \leq 0.01$).

Compound	Trx reduction	±SD	р
С	0	4.9	
FCP6	18.3	8.2	**
FCP7	3.86	9.2	
FCP8	7.5	5.8	
FCP9	9.2	0.98	**

The strongest effect we observed for FCP9 (about 60% as compared with the control) and FCP6 (about 20% as compared with the control).

We cannot exclude the possibility that FCPs affect the two remaining systems -Trx or Grx. This phenomenon needs further studies. Moreover, this is not a pure speculation since we observed an elevated expression of HMOX-1 gene. This effect was observed in cells when the Trx system was inhibited.²²

Indeed, FCP6 as well as FCP9 decreased the Trx activity as shown in Table 2. FCP6 lowered the Trx activity about 20% whereas, FCP9 about 10% as compared with control. This data is in agreement with our results suggesting that FCP6 is the most effective compound.

Our study clearly supports the hypothetical relationships between metabolic conversion of FCPs and ROS generation, which lead to cancer cell death. The results of plasmid relaxation assay and kinetics of the DNA damage performed in 4° C to slow down metabolism suggest that FCP induced DNA damage indirectly, and most likely they are the result of their participation in metabolism in cells. After analysis of data obtained from measurement of ROS, we can draw the conclusion that anticancer properties of FCPs are connected with generation of oxidative stress. FCPs mechanism of action may be connected with inhibition of cancer cell glucose metabolism or glucose uptake. This could enhance cytotoxicity and oxidative stress by limiting the recycling of NADP+ to NADPH via the pentose phosphate pathway. It can be also related with decreasing the formation of pyruvate by glycolysis. Another hypothesis is connected with modulation of cellular redox homeostasis by FCPs metabolites.

It is anticipated that S-bond could be hydrolyzed within the cell. As a result, FCPs metabolites have SH group that can block cellular Trx system. The relationship of oxidative stress to the overall mechanism by which FCP kills cancer cells is not well understood and should be subjected for further investigation.

Thus, taken together, our investigations reveal FCP6 as a potent anticancer agent with a mechanism of action that involves enhancement of ROS levels in cancer cells. FCP6 is able to induce the oxidative DNA damage in cancer cells, destabilize cellular redox system by the GSH depletion and reduction of Trx system, and change the expression level of genes activated in response to the oxidative stress. In our opinion, FCP6 deserves further detailed biological investigation.

Acknowledgments

This work was supported by the Polish National Science Centre, decision nr UMO-2011/01/B/NZ4/03391 (T.P.) and UMO-2014/15/ N/NZ7/02948 (J.S.).

A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.01. 064.

References

- Brás NF, Cerqueira NM, Ramos MJ, Fernandes PA. Expert Opin Ther Pat. 2014;24:857–874.
- 2. Witczak ZJ, Culhane JM. Appl Microbiol Biotechnol. 2005;69:237-244.
- 3. Scanlan E, Corcé V, Malone A. Molecules. 2014;19:19137–19151.
- 4. Witczak ZJ. Curr Med Chem. 1999;6:165–178.
- Czubatka A, Sarnik J, Lucent D, Blasiak J, Witczak ZJ, Poplawski T. Chem Biol Interact. 2015;227:77–88.
- 6. Dey PM, Witczak ZJ. Mini Rev Med Chem. 2003;3:271-280.
- Witczak ZJ, Sarnik J, Czubatka A, Forma E, Poplawski T. Bioorg Med Chem Lett. 2014;24:5606–5611.
- Witczak ZJ, Poplawski T, Czubatka A, et al. Bioorg Med Chem Lett. 2014;24:1752–1757.
- Markoe AM, Risch VR, Emrich J, Fala S, Brady LW. Cancer Clin Trials. 1980;3:155–163.
- 10. Zan X, Gao J, Gu G, et al. Bioorg Med Chem Lett. 2014;24:1600-1604.
- 11. Kim SH, Kim JH, Hahn EW. Cancer Res. 1978;38:2935–2938.
- Collins AR, Dobson VL, Dušinská M, Kennedy G, Štětina R. Mutat Res Mol Mech Mutagen. 1997;375:183–193.
- Blasiak J, Synowiec E, Tarnawska J, Czarny P, Poplawski T, Reiter R. J Mol Biol Rep. 2012;39:7487–7496.
- 14. Swindle EJ, Metcalfe DD, Coleman JW. J Biol Chem. 2004;279:48751-48759.
- 15. Lu J, Holmgren A. Free Radic Biol Med. 2014;66:75-87.
- Dohi Y, Alam J, Yoshizumi M, Sun J, Igarashi K. Antioxid Re-dox Signal. 2006;8:60-67.
- Chen Y, Shertzer HG, Schneider SN, Nebert DW, Dalton TP. J Biol Chem. 2005;280:33766–33774.
- 18. Maines MD, Panahian N. Adv Exp Med Biol. 2001;502:249-272.
- 19. Chary P, Dillon D, Schroeder AL, Natvig DO. Genetics. 1994;137:723-730.
- 20. Kayanoki Y, Fujii J, Islam KN, et al. J Biochem. 1996;119:817-822.
- **21.** Aoyama K, Nakaki T. *Mol Basel Switz*. 2015;20:8742–8758.
- 22. Raninga PV, Di Trapani G, Vuckovic S, Tonissen KF. Redox Biol. 2016;8:175–185.

Supporting Information

The induction of oxidative stress in cervix carcinoma cells by levoglucosenone derived 4-S-salicyl derivative and (1-4)-S-thio-disaccharides. Part 4.

Joanna Sarnik †, Anna Czubatka-Bienkowska †, Anna Macieja †, Roman Bielski ‡, Zbigniew J. Witczak‡*, Tomasz Poplawski †

†Department of Molecular Genetics, University of Lodz, Lodz 90-236, Poland.

‡ Department of Pharmaceutical Sciences, Nesbitt School of Pharmacy, Wilkes University, 84 W. South Street, Wilkes-Barre, USA

E-mail: zbigniew.witczak@wilkes.edu

Table of Contents

1.

Page

Ma	terials and methods	3s
•	Cell culture	3s
•	Detection of DNA damage by single cell electrophoresis (comet assay)	3s
•	DNA damage and repair kinetics	4s
•	Plasmid relaxation assay	4s
•	Measured the level of reactive oxygen species (ROS) CM-H2DCFDA	5s
•	Estimation of intracellular nitric oxide (NO) using DAF2-DA	5s
•	Detection of reduction DNA damage in a presence of antioxidant	5s
•	GSH determination by mBCl and Flow Cytometry	6s
•	Real-time PCR for gene expression analyses	6s
•	Thioredoxin reductase activity	6s

2. Results

8s

1. Materials and methods

Cell culture

In order to evaluate the biological properties of (1-4)-*S*-thiodisaccharides we choose hormonedependent cell line – HeLa from HPA Culture Collections. This cancer cell line are commonly used and is well described including their genetic profile. HeLa cell line (cervix adenocarcinoma) were cultured in Ham's F-12 medium (Lonza) containing L-glutamine and supplemented with heat-inactivated 10% fetal bovine serum (BII) and 1% penicillin-streptomycin mix (Sigma). Cells were maintained in humidified incubator at 37° C and 5% CO₂ and were cultured to approximately 70-80% confluence and passaged every 2-3 days. We used Accutase (Sigma) to detached cells from the surface prior to experiments.

Detection of DNA damage by single cell electrophoresis (comet assay)

In order To evaluate genotoxicity effects of tested compounds we used comet assay in three version – alkaline, neutral pH and pH 12.1 version. This method is based on the ability of migration in agarose gel in electric field negatively charged fragments of DNA. The level of DNA migration depends directly on the DNA damage present in the cells.

HeLa cells were incubated with FCPs in 1 h at 37° C. We used negative and positive controls. The first one was cells incubated with fresh medium only, the second cells exposed to hydrogen peroxide at 20 µM applied for 15 min at 4° C. Suspension of cells (5x 10⁴ cells per probe) was mixed with 0,75% LMP agarose and spread onto a microscope glass slide precoated with 0,5% NMP agarose after incubation with FCPs. The next step was carried out at pH 10 (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100 as detergent) for 1 hour at 4° C. Following lysis of cells with detergent at high salt concentration in alkali version slides were washed for 20 min in the unwinding buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH >13). Electrophoresis was performed in an alkaline buffer (30 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH >13) for 20 min at 17 V, 32 mA. In the neutral version of the assay unwinding and electrophoresis buffer were the same (300 mM sodium acetate and 100 mM Tris with pH adjusted to 9.0 with glacial acetic acid). Electrophoresis in this variant was performed at 9 V, 100mA for 1 h. In the pH 12.1 version electrophoresis was conducted in 300 mM NaOH and 1 mM EDTA buffer at pH 12.1 adjusted with glacial acetic acid and with the remaining compounds as in the alkaline version. After electrophoresis, slides were washed with destile water, left to drain and then stained in a humidified chamber with 2 mg/ml DAPI for at least 60 min.

The slides were examined in fluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan) attached to a COHU 4910 video camera (Cohu, Inc., San Diego, CA) equipped with a UV filter block with an excitation filter (359 nm) and barrier filter (461 nm) and connected to a personal computer-based image analysis system, Lucia-Comet v. 4.51 (Laboratory Imaging, Praha, Czech Republic). We randomly selected 100 comets from each slide to determine a level of DNA damage via measure a % DNA in comet tail. Each experiment was repeated four times.

DNA damage and repair kinetics

We exposed cells to FCPs for 0, 15, 30, 45 and 120 minutes at 37° C and 4° C, to evaluate a kinetics of DNA damage. After that we proceed with comet assay. Concentration of the FCPs was chosen based on results of alkaline version of comet assay and introduced DNA lesions visible as 10-20% DNA in comet tail.

To determine the kinetics of DNA repair cells were exposed to compounds at the same concentration like in DNA damage kinetics experiment at 1 h at 37° C. Next, cells were washed and incubate in proper medium for 0, 15, 30, 45 and 120 minutes at 37° C. In this step aliquots of the suspension were taken immediately after end of time of incubations. Each experiment included a positive control, which was hydrogen peroxide at 20 μ M applied for 15 min at 4° C. After that we proceed with comet assay

Plasmid relaxation assay

To confirm the comet assay results we used pUC19 plasmids in relaxation assay. To check the migration of its multimeric forms (supercoiled CCC, open circular OC and linear L) we conducted an electrophoresis in 1% agarose gel (EurX) in 1x Tris-acetate-EDTA buffer. Structural differences between supercoiled, open circular and linear forms of the plasmid accounted for their different electrophoretic mobility. As a positive control plasmids were exposed to EcoRI. EcoRI as restriction enzymes induced one strand breaks in plasmid DNA and caused the relaxation of supercoiled plasmid. The ability of FCPs to induced damage DNA as SSB or DSB was observed after 1h in 37° C incubation with plasmid DNA. Induction of DNA damage could be observed as increasing of presence of OC or L forms and decreasing CCC form.

Measured the level of reactive oxygen species (ROS) CM-H2DCFDA

To evaluate intracellular oxidative stress we used 2',7'-Dichlorofluorescin diacetate (CM-H2DCFDA). It is a cell-permeable non-fluorescent probe and de-esterified intracellularly and

turns to highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein upon oxidation. Cells ($50x \ 10^4$ per well) were placed in the 96-wells black plates with transparent bottom and preincubated 30 min in 10 μ M concentration with CM-H2DCFDA in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS). After preincubation with CM-H2DCFDA cells were washed with HBSS and incubated 1 h with tested compounds in concentration used in DNA damage and repair kinetics. Cells incubated with tert-Butyl hydroperoxide (TBHP) (SIGMA) in 100 μ M concentration were used as positive control. Cells preincubated with CM-H2DCFDA in HBSS were negative control. After incubation with FCPs fluorescence intensity was measured in microplate reader with an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 528 nm. Results in tested probes were calculated as % of negative control

Estimation of intracellular nitric oxide (NO) using DAF2-DA

To measure the level of nitric oxide which can be formed during action of FCPs we used cellpermeable fluorescent detector of nitric oxide in living cells -4,5 -Diaminofluorescein diacetate (DAF-2 DA) (Sigma). Further proceeding as described in protocol for measured the level of reactive oxygen species (ROS) except the preincubation step with DAF-2 DA which lasted for 15 minutes.

Detection of reduction DNA damage in a presence of antioxidant

To assess the reduction of DNA damage induced in HeLa cell line we used preincubation with two antioxidants: Vitamin E and Epicatechin. Antioxidants inhibited oxidation reactions in cells and removed free radical intermediates, which may arise by the activity of FCPs Preincubation with Vitamin E and Epicatechin takes for few second in concentration 25 μ M and 10 μ M respectively. We incubate cells subsequently for 1 h with concentration of the FCPs which were chosen based on results of alkaline version of comet assay and introduced DNA lesions visible as 10-20% DNA in comet tail. Each experiment included a negative control (untreated cells) positive control, which was hydrogen peroxide at 20 μ M applied for 15 min at 4° C separately and with antioxidants, control with Vitamin E at 25 μ M and control with Epicatechin at 10 μ M. After 1 h incubation with FCPs we proceed with alkaline version of comet assay.

GSH determination by mBCl and Flow Cytometry

To determine the depletion of GSH we used a mBCl (Monochlorobimane, SIGMA) which is cell-permeant probe for quantifying glutathione levels in cells. Stock solution of mBCl was prepared in DMSO in 50 μ M concentration and was kept refrigerated in dark. We used also PI (propidium iodide) to evaluate cell viability in all probes.

Cells were seed on 6-wells plate and treated with FCPs for 1 h. After incubation with tested compounds cells were detached from the surface with accutase, washed twice with PBS and incubated 30 min with 50 μ M mBCl and 10 μ M PI in PBS at room temperature. Flow cytometry was used for quantitation of GSH-mBCl fluorescence. Data were analyzed on FACSDiva Version 6.2. Depletion of GSH was determined after 24 incubation using 0,5 mM BSO (D,L-buthionine-S,R-sulfoximine) as positive control. GSH-mBCl fluorescence in probes was compared to untreated control (100%).

Real-time PCR for gene expression analyses

Total RNA was isolated from HeLa cells after 4 h treatment with tested compounds in concentration used in ROS detection. To extract RNA we used RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen). The final RNA concentration and purity was measured using a spectrophotometer (BioTek) and Take3 Micro-Volume plates. For analysis of mRNA expression 100 ng of total RNA (in 10 μ l reaction volume) was used.

We analyzed 13 genes in biological pathways activated in response to oxidative stress: SOD1, SOD2, HMOX, GCLM, TXN, FHL2, NCOA7, NQO1, NOX4, NOX5, CAT, GPX1, GPX4. Reference gene GAPDH and other analysed genes was performed using TaqMan (Life technologies), SensiFAST Probe No-ROX One-Step (Bioline) and CFX96 RealTime System (BioRad). The relative gene expression level was determined from six replicates using the formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Thioredoxin reductase activity

To evaluate the thioredoxin reductase (TrxR) activity we used a colorimetric assay (Thioredoxin reductase assay kit, SIGMA). This method is based on reduction of DTNB (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic) acid) with NADPH to TNB (5-thio-2-nitrobenzoic acid). This reduction is manifested by production of yellow color measured at 412 nm. We proceed according to the protocol for 96 well plate assay except total volume of probes which was 350 μ l. We measured OD 412 at T0 and again after incubation the reaction at 25°C for 1h (T60).

First 10^6 cells were seed on plates (10 mm) then treated with FCPs for 14h with IC50. After incubation with tested compounds cells were washed with PBS and incubated with 1 ml Cell Lytic M and protease Inhibitor Cocktail (SIGMA) 15 min on the shaker at room temperature. The lysate was centrifuged at 10000 x g for 10 min. Supernatant was used as the enzyme sample. We determined the protein concentration of the supernatant using Bradford Reagent (SIGMA) and

protein standard (BSA) solution (SIGMA). We used 25 μ g of protein for one probes in thioredoxin reductase activity assay. TrxR activity was calculated using formula contained in the protocol and received results were compared to untreated control (100%). The experiment was repeted three times in two replicates.

2. Results



Figure 1s. Agarose gel with puC19 after relaxation assay and electrophoresis. There can be seen three forms of pUC19 conformation from the top: OC, L, CCC. From left in the first path is control pUC19 then in order: pUC19 after EcoRI digestion, pUC19 after 1h exposure to FCP6-9.



Figure 2s. The kinetics of repair of FCPs-induced DNA damage in HeLa cell line. The percentage of DNA damage was analyzed after 0, 15, 30, 45 and 120 minutes of repair incubation in 37° C. Data were received from alkaline version of comet assay. Data represent the mean \pm SEM of quadruplicate.



Figure 3s. The level of intracellular nitric oxide induced in HeLa cells after 1h incubation with tested compounds in comparison to untreated control. The percentage of DAF-2 DA fluorescence was analyzed after 15 min of preincubation with 10 μ M DAF-2 DA and 1h incubation with FCPs. Data represent the mean \pm SD of triplicate(***p≤0,001).

Contents lists available at ScienceDirect



Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl



(1–4)-Thiodisaccharides as anticancer agents. Part 5. Evaluation of anticancer activity and investigation of mechanism of action

Joanna Sarnik^{a,f}, Arkadiusz Gajek^b, Monika Toma^c, Jakub Pawelczyk^d, Sebastian Rykowski^d, Agnieszka Olejniczak^d, Tomasz Sliwinski^c, Roman Bielski^e, Zbigniew J. Witczak^{e,*}, Tomasz Poplawski^a

^a Department of Molecular Genetics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 90-236 Lodz, Poland

^b Department of Medical Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 90-236 Lodz, Poland

^c Laboratory of Medical Genetics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 90-236 Lodz, Poland

^d Institute of Medical Biology, Polish Academy of Sciences, 93-232 Lodz, Poland

e Department of Pharmaceutical Sciences, Nesbitt School of Pharmacy, Wilkes University, Wilkes-Barre, PA 18766, USA

^f Department of Rheumatology, Medical University of Lodz, 92-115 Lodz, Poland

ARTICLE INFO

Keywords: Thiodisaccharides Glioma Oxidative stress Endoplasmic reticulum (ER) stress Thioredoxin system

ABSTRACT

(1-4)-Thiodisaccharides, thiosugars with the 1–4-thio bridge, were recently shown to induce oxidative stress, as well as, apoptosis in cancer cells in the low micromolar range; however, the detailed mechanism of their anticancer action still remains unknown. In order to clarify the mechanism of (1-4)- thiodisaccharides action, we performed a series of tests including cytotoxic, clonogenic and apoptosis assays using an in vitro glioma cancer model with one ATCC cell line U87 and two novel glioma cell lines derived from cancer patients – H6PX and H7PX. We also evaluated the ability of (1-4)-thiodisaccharides to interfere with protein folding and synthesis processes, as well as, the thioredoxin system. (1-4)-thiodisaccharides induced glioma cell death, which were found to be accompanied with endoplasmic reticulum stress, inhibition of global protein synthesis, reduced overall cellular thiol level and thioredoxin reductase activity. We also performed a RT-PCR and Elisa analysis of (1-4)-thiodisaccharides. We observed a significant increase of expression in key markers of endoplasmic reticulum stress and pro-apoptotic protein, FASLG. We proposed that (1-4)-thiodisaccharides react with cellular thiols and disturb any cellular thiol-depended processes like thioredoxin system or protein folding.

Sulfur plays an elementary role in biological systems. This element is an important component in living systems as a constituent of proteins, coenzymes and cellular metabolites. It is crucial in many biological processes including cellular transport or antioxidant defense. The reduced form of sulfur protects against radiation damage or oxygen toxicity due to its simplicity in oxidation.¹

Sulfur-containing natural compounds are widely used as therapeutic agents in treatment of various human diseases (reviewed at Refs. 2,3). Based on these natural examples it is no surprise that medicinal chemistry also used sulfur to develop novel, sulfur-containing, biological active drugs. In these drugs sulfur exists as sulfonamide, sulfone, sulfinyl, thioester, thioether, thiophene, thiazole, β -lactam, thiazepine/thiazine, or thiadiazole in many organic chemistry compounds including thiosugars.^{4,5} Sulfur in thiosugars replace oxygen and usually occurs as a thiol group, in the 1 and 5 position of monosaccharides, or

could form a S-glucosidal bond in disaccharides. Replacement of oxygen to the sulfur is tolerated by most biological systems. The presence of sulfur, presented as a heteroatom or one of the components of the functional groups of sugars, varies dramatically with its physicochemical properties and biological properties – i.e. thiosugars become insensitive to enzymatic and chemical degradation as compared with conventional sugars.⁶

Recently, we developed a collection of thiosugars with anticancer potential denoted as FCP (Functional Carb Pharmacophores) including monosaccharides containing a hemi-thioacetal functionality, carbohydrate derivative with a methanesulfonamido group, (1–4)-thiodisaccharides and *S*-glycosylated thiosemicarbazones.^{7–12} Among the tested compounds, the most promising was (1–4)-thiodisaccharide (named as FCP6), but detailed mechanism of its action remains unknown; however we show that FCP6 induced oxidative stress lowered

* Corresponding author.

E-mail address: zbigniew.witczak@wilkes.edu (Z.J. Witczak).

https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.126904

Received 20 October 2019; Received in revised form 8 December 2019; Accepted 9 December 2019 Available online 17 December 2019 0960-894X/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Table 1

IC50 and IC20 values	s ¹ presented in μM.
----------------------	---------------------------------

Cell line/compound	U-87		Н6РХ		Н7РХ	
	IC50	IC20	IC50	IC20	IC50	IC20
FCP6 FCP8	65,2 922,1	51,4 784,4	132,8 955,2	112,7 921,9	157,8 736,1	133,5 653,9

¹ Cancer cells were incubated in the presence of increased concentrations of tested compounds for 14 h at 37 °C. The most cytotoxic was FCP6 and the most responsive line U-87. Data represent the mean of triplicate of independent tests.



Fig. 1. This figure present clonogenic assay performed on U-87 (a–c), H6PX (d–f) and H7PX (g–i), Control experiment are shown on a, d and g. Results from IC20 of FCP6 and FCP8 are respectively b, e, h and c, f, i. Treatment with FCP6 and FCP8 caused growth and colony formation inhibition and the most effective was FCP6 – see detailed values in Table 2. After 14 h incubation with IC20 of FCPs cells were planted in an amount of 1000 per plates and incubated 2 weeks, after that cells were stained with crystal violet and colony were counted under the microscope.

Table 2 Clonogenic assay.¹

Probes Ratio of the number of colonies to the number of cells see					
	U-87	Н6РХ	Н7РХ		
Control	100%	100%	100%		
FCP6 IC20	40%	46%	63%		
FCP8 IC20	86%	75%	98%		

¹ Cells were seeded after treatment with IC20 of tested compounds for 14 h. Results are showed as % of control. Planting efficiency presented in % values is the ratio of the number of colonies to the number of cells seeded PE = (no. of colonies formed)/(no.of cells seeded) \times 100% Data represent the mean of triplicate.

the cellular GSH level.^{9,13} FCP6 has two sugar moieties linked by a sulfur bridge, and it has blocked 2, 3, 4, and 6 carbon atoms by acetyl moieties. The aim of this paper is to establish molecular mechanism of anticancer action of (1-4)-thiodisaccharides using glioma cell lines as a cancer model. Glioma is one of the most lethal, highly invasive and aggressive with a bad prognosis cancer. Despite advanced techniques in radiotherapy or chemotherapy, the treatment is not effective.

Table 3	
Apoptosis induction	.1

	Untreated Control	FCP6
U-87		
Viable [%]	93,1	37,8
Apoptotic [%]	6,9	62,2
Н6РХ		
Viable [%]	90,3	19,6
Apoptotic [%]	9,7	80,4
Н7РХ		
Viable [%]	90,4	56,7
Apoptotic [%]	9,6	43,3

 1 Cells were treated with IC20 of tested compounds for 4 h. The cells that considered viable are FITC Annexin V and PI negative, samples with cells in early apoptosis with membrane integrity intact are FITC Annexin positive and PI negative, and in the end stage of apoptosis or death sample with cells are both FITC Annexin and PI positive. Apoptotic cells are presented as the sum of cells stained with FITC Annexin positive and PI negative and FITC Annexin and PI positive and PI negative and FITC Annexin and PI positive and PI negative and FITC Annexin and PI positive and PI negative and FITC Annexin and PI positive and PI negative and FITC Annexin and PI positive and pI negative and FITC Annexin and PI positive and PI negative and FITC Annexin and PI positive and pI negative and FITC Annexin and PI positive and PI negative and FITC Annexin and PI positive and pI negative and FITC Annexin and PI positive and pI negative and FITC Annexin and PI positive and pI negative and FITC Annexin and PI positive and pI negative and FITC Annexin and PI positive and given in percentage value. We used untreated cells stained with both FITC Annexin and PI as negative control. Cells treated with 100 μ M camptothecin served as positive control for 24 h. Data represents the mean of triplicate of independent tests.

Table 4

Gene expression involved in apoptosis¹

	FCP6	
U-87		SD
BCL2	-0,35↓	± 0,13
FASLG	3,25↑*	± 1,35
H6PX		
BCL2	-0,40↓	± 0,18
FASLG	4,46↑***	± 0,32
H7PX		
BCL2	-0,69↓	± 0,11
FASLG	6,12↑	± 1,33

¹ The level of the relative gene expression of genes involved in apoptosis pathway. The increase (↑) and decrease(↓) in gene expression in cells treated with the compounds (IC20 for 4 h) was determined relative to untreated cells (Control: 1,00). The GAPDH gene was the endogenous control of the experiment. We can observe an increase in FASLG expression and a slight decrease in BCL2. The relative gene expression level was determined from six replicates using TaqMan probes and the 2-∆∆Ct method and presented as mean ± SD (***p ≤ 0.001).

Approximately 20% of all brain tumors at the time of diagnosis are primary origin and 80% are formed as a result of metastasis. The median survival of glioma patients is 1 year, which means that we are unable to prolong survival. The treatment is limited by the brain-blood barrier and topographically diffuse nature of glioma (limited surgery option).

We used as a glioma cancer model three cancer cell lines: well described and commonly usedATCC glioma cell line – U87 and two novel glioma cell lines derived from cancer patients – H6PX and H7PX. These cell lines represent grade IV glioma and were classified as glioblastoma according to the World Health Organization (WHO) classification of tumors of the central nervous system.¹⁴

CCK8 assay was carried out to evaluate the cytotoxic effect of the FCP6 and FCP8 on glioma cells after 14 h treatment with a range of concentration of FCPs from 10 to 500 μ M. FCP6 was cytotoxic for all studied glioblastoma cells in micromolar range as expected whereas FCP8 was not. It confirmed our previous results that FCP6 has more potential as an anticancer agent as FCP8.⁹ The calculated IC₅₀and IC₂₀value are presented in Table 1.

The most responsive line to the FCP6 was U-87 with IC_{50} of



Fig. 2. This figure present a results from colorimetric thioredoxin reductase assay performed on U-87 H6PX and H7PX. Cells were incubated with FCP6 for 1 h at IC20. TrxR activity in cell lysate was measured immediately (time 0) and after 4 h with 412 nm on microplate reader. We observed the reduction of DTNB with NADPH to TNB in control cells manifested by yellow control within 4 h Differences between the time 0 and 4 h have been calculated and compared with cells after incubation with FCP6. We observed a statistically significant reduction of TrxR activity. Data represent % reduction of activity of TrxR referred to control as mean \pm SD of triplicate (***p \leq 0.001).

65,2 μ M. H6PX and H7PX cell lines were more resistant than ATCC cell line (IC₅₀ = 132,8 μ M and 157,8 μ M respectively). It is no surprise for us as these two cell lines are classified as more chemoresistant then U87.¹⁵ CCK-8 assay is based on reduction of tetrazolium salt by dehydrogenase activities in cells. Therefore, it measures some aspect of cellular metabolism plotted as an index of metabolic activity, that should, in principle, correlate with the number of viable cells. It has also one additional disadvantage. Compounds that induce severe membrane damage and increase intracellular concentration of NADH in cells, enhance the nonspecific reduction of tetrazolium salt¹⁶ and



Fig. 4. Measured the level of reactive oxygen species (ROS) with CM-H2DCFDA. Cells incubated 1 h with IC20 of tested compounds and 1 h with *tert*-Butyl hydroperoxide (TBHP) in 100 μ M concentration as a positive control (medium-gray bars). We can observed the statistically significant increased in fluorescence intensity after incubation with FCP6 (grey bars). Fluorescence intensity was measured on microplate reader with an Ex/Em 485/528 nm. Data represent mean values relative to control – black bars (1,0 value) ± SD of triplicate (***p \leq 0.001).

produce false positive signals, especially in primaryglioblastoma cells. Therefore, to produce more reliable and accurate cytotoxic results on primary glioblastoma cells we expanded the present study and utilized clonogenic assay to test FCP6 whenever FCP6 and/or FCP8 inhibits colony formation of human glioblastoma cells in comparison of our previous studies. The results of clonogenic assay are presented on Fig. 1 and Table 2. FCP6 at IC₂₀ disturbed glioma cells proliferation, but FCP8 generally did not. As seen on Fig. 1 glioblastoma cell colonies are visible as spheres and then counted after staining with crystal violet for 1 h. Results in Table 2 are presented as ratio of the number colonies to the number of cells seeded and were counted as a number of colonies



Fig. 3. These figures present a results from fluorescent dying of living cells with TRFS-GREEN. Cells were seeded on 96-well black plates with clear bottom and incubate with 10 μM TRFS-Green for 4 h after 1 h incubation with IC20 of tested compound. Cells were imaged under fluorescent microscope Ex/Em 438/538 nm. Fluorescence intensity indicates TrxR activity which can be seen in the control cells (first line) compared to lower intensity after incubation with FCP6 demonstrating the inhibition of activity of this enzyme.



Fig. 5. Assessment of intracellular thiols in cell lysate. The absorbance was measured at 412 nm. after incubation with 1 mM DTNB in 6 M guanidine hydrochloride, pH 8.0. at room temperature for a few minutes. Total thiol levels were measured using DTNB titration. Thiols levels were calculated through a calibration curve using GSH as the standard and compared to the control probe. We can observed a statistically significant reduction in alltested cell lines. Data represent the mean \pm SD of triplicate (***p \leq 0.001).

formed from 1000 cells. In the next experiments we focused only on FCP6 at IC_{20} as we don't want to study mechanism of FCP6 action in dead cells (at IC_{20} 80% of cancer cells are viable but under the influence of studied compound) and FCP8 does not have enough strong anticancer potential. It is some kind of surprise for us as FCP8 has better pharmacological properties interpreted as log P and C log P values.¹² However, the sulfur is better available for cellular components in FCP6. The dihedral angles are in ranges of 110°, 100° and 109°, but in contrast the FCP8 are in the different ranges of 128°, 113° and 97°. It seems that different values of the dihedral angles of sulfur bridges of FCP6 and FCP8 are an important factor for the cytotoxicity/bioactivity.

Next, we checked the ability of FCP6 to induce apoptosis. We used a

U-87

flow cytometry assay with AnnexinV-FITC/PI and RT-PCR to analyze this programmed cell death. FCP6 increased population of apoptotic cells (Table 3) and again this effect was stronger in U-87 cells where we observed 62.2% of apoptotic cells vs 80.4% in H6PX and 43.3% in H7PX lines after 4 h of incubation with FCP6 at IC_{20} .

We also observed an increase of expression of FASLG gene encoding pro-apoptotic protein FASL and decreased expression of anti-apoptotic BCL2 gene (Table 4) in all studied glioblastoma cell lines after 4 h of incubationwith FCP6 at IC_{20}

We have previously shown that FCPs interfered with the two systems that defend cells against oxidative stress and ROS: thioredoxin (Trx) and glutathione (GSH) system. These are key pathways involved in maintaining of redox homeostasis and include also SOD system, Nrf2/Keap1-ARE pathway and APE/Ref1, Cdc25 phosphatases and zincfinger transcription factors. To analyze this phenomena further we performedthioredoxin activity assay. It utilized thecolorimetric method based in the reduction of DTNB with NADPH to TNB that produces yellow color and the fluorescence method with TRFS-GREEN probe. In colorimetric method, cells were incubated with FCP6 for 1 h at IC₂₀. Next, they were lysed, and we measured OD412 nm immediately; and after 4 h to quantify the activity of TrxR. We observed a statistically significant reduction of TrxR activity in comparison to untreated control (Fig. 2).

TRFS-GREEN probe was also used to visualization of activity of TrxR in living cells. Cells were treated as in the colorimetric assay for 1 h with IC20 on 96-wells plate. After that they were incubated with TRFS-GREEN probe for 4 h, and images under a fluorescent microscope were taken. We observed the decrease influorescence in all tested glioma cell lines incubated with FCP6 as presented on Fig. 3. The results of both tests complement each other and confirm that FCP6 inhibited TrxR activity. TrxR is involved in the defense against oxidative stress and play a key role in the homeostasis of the cellular redox state.¹⁷ It represents a promising cancer target not only because ofantioxidant properties, but also it is involved in cell proliferation and participates in regulating apoptosis by interacting with p53. Moreover Trx-TrxR system have been shown to be upregulated in many cancers and

H7PX

Control

FCP6

Image: Control

</

H6PX

Fig. 6. This figures present results from fluorescent test Click-IT HPG Alexa Fluor[®] Protein Synthesis Assay Kit, based on labeled methionine. Cells were treated with IC20 for 14 h and co incubate with medium with labeled methionine. After that cells were fixed with 3,7% formaldehyde in PBS and treated according to protocol. Fluorescence signal indicates protein synthesis and present of labeled methionine in the protein structure. In the control cells we can observed high fluorescence signal and unhalted protein synthesis after 14 incubation with medium containing labeled methionine compared to cells treated with IC20. Cells treated with anisomycin for 24 h at 0,2 µM concentration served as a positive control (not shown). Protein synthesis was detected using a fluorescent microscope.



Fig. 7. This figures present results from ELISA as values relative to untreated control (C). Data from this cell-based ELISA were normalized to anti-eIF2 alpha antibody and GAPDH (presented in first line) according to protocol. Cells were treated with IC20 of FCP6 for 1–4 h. After incubation cells were fixed with fixing solution with 4% formaldehyde and treated according to protocol. OD at 415 nm was measured. We can observed a statistically significant increase on protein level in ER stress marker phospho-eIF2 alpha within 4 h compare to untreated control. Data represent the mean of triplicate \pm SD (***p \leq 0.001).



Fig. 8. This figures present results from ELISA for three ER stress markers GRP78, DDIT3 and ATF4. All data are presented as value relative to untreated control cells (C). Cells were treated with IC20 of FCP6 for 1–4 h. After that we used a RIPA buffer with a protein inhibitor cocktail to prepare cell lysate. ELISA was performed according to protocol and value was measured with OD at 415 nm. Results shown in the graph regarding GRP78 protein testify to its increased within 1 h of incubation (medium-gray bars). After 1 h we can observed statistically significant decrease in protein expression of this protein (dark gray and black bars). Results for DDIT3 and ATF4 show the highest increase in their expression after 4 h incubation for both FCPs (black bars). Data represent the mean \pm SD of triplicate (***p \leq 0.001).

 Table 5

 Expression of ER stress markers in U-87.¹

Gene/compound	FCP6						
	1 h	SD	2 h	SD			
GRP78	1,81↑***	± 0,11	1,38↑**	± 0,10			
PDIA4	1,90↑**	± 0,16	1,24	$\pm 0,31$			
EDEM	2,39↑**	± 0,75	1,1	± 0,29			
DDIT3	7,01↑***	± 0,70	0,11↓***	± 0,04			
DNAJC3	1,07	± 0,32	2,43†***	± 0,31			

¹ The level of the relative gene expression of genes involved in ER stress was observed within 2 h of incubation with IC20 of FCP6. The increase (†) and decrease(↓) in gene expression in cells treated with the compounds was determined relative to untreated cells (Control: 1,00). The GAPDH gene was the endogenous control of the experiment. Treatment with each of FCPs caused statistically significant growth in ER stress marker expression within 2 h in U-87 cell line in most of the tested genes after 1 h. The relative gene expression level was determined from six replicates using the TaqMan probes and $2-\Delta\Delta$ Ct method and presented as mean ± SD (***p ≤ 0.001).

inhibition of Trx-TrxR system slowdowncell proliferation.¹⁸ Inhibition of TrxR activity could result in an increase of oxidative stress as TrxR participates in intracellular, anti-oxidative response.

Indeed we observed an elevated level of reactive oxygen species (ROS) in all studied glioma cell lines compared to untreated control after 1 h incubation with IC20 of tested compounds. To evaluate intracellular oxidative stress we used 2',7'-Dichlorofluorescin diacetate (CM-H2DCFDA).

The highest level was observed in the U-87 cell line as presented on Fig 4. Trx-TrxR system relies on thiol/disulfide exchange reaction. We hypothesized that FCP6 could interfere with thiol/disulfide in an active site of Trx-TrxR as FCP6 has a sulfur on strategic position. Indeed we observed a decrease in intracellular thiols level in cells after 1 h treatment with IC20 of tested compounds (Fig. 5).

We observed in H6PX cells (22,32%), H7PX (19,66%) and U87 cells (11,82%) the highest reduction compared to untreated control. These data suggest that FCP6 demonstrates its anti-glioma activity *via* a thiol-dependent mechanism as it lowered intracellular thiols level. Decreasing of the intracellular thiols level has dramatic consequences for cell metabolism. The thiol group is predominantly found in cysteines. Cysteines act as stabilizing, catalytic, metal-binding and/or redox-regulatory entities. They are also used for formation of one or more disulfide bonds in proteins during the folding process. Any cellular thiol imbalance resulted in inhibition of thiol-based post-translational protein modifications. Indeed we observed that FCP6 inhibits protein synthesis using a fluorescence method based on modified methionine (Fig. 6). Moreover, we observed increasing of endoplasmic reticulum (ER) stress markers on mRNA and protein levels (Figs. 7, 8 and Table 5).

It is no surprise for us as the ER is crucial for folding and stabilization of secretory and membrane proteins. We suggest that FCP6 forms disulfide with exposed cysteine residues on newly synthetized proteins and blocks oxidative protein folding that relies on GSH. Misfolded proteins accumulate and trigger the unfolded protein response (UPR). UPR attempt to restore protein production and cellular homeostasis, and if it fails to reestablish normal ER function, the cells are prompted to apoptosis. Supporting this idea, we showed that (1) FCP6 induces expression of two UPR markers: CHOP and GRP78 which is in agreement with findings related to other compounds with sulfur bridge,^{19,20} (2) global protein synthesis process is decreased and (3) cells undergo apoptosis after incubations with FCP6. GRP78 is ER-resident chaperone, realized from ER upon UPR.²¹ In contrastCHOP is a transcription factor that is upregulated during the prolonged ER stress. Interestingly CHOP downregulates antiapoptotic proteins like Bcl-2 and upregulate FasL to promote apoptosis.2



Fig. 9. This figures present uptake of FCP6 by U-87 cells in time (0–120 min). Cells were incubated with trited FCP6 within 2 h in 37 °C and 4 °C. Cells fixed in 4% formaldehyde were served as control. After incubation the cell were washed with PBS and spin-down for further analysis. Data represent means \pm SD of counts per minute (cpm) from three independent experiments using 1450 Microbeta Plus Liquid Scintillation Counter. We can observed the increase accumulation of trited FCP6 within U-87 cells at 37 °C. We compare probes in two ways: 4 °C vs 37 °C and both probes 4 °C and 37 °C vs fixed cells (***p \leq 0.001 relative to cells treated in 4 °C and ^{###}p \leq 0.001 relative to fixed cells).

Our data suggest such mechanism of apoptosis induction in human glioma cells: upregulation of pro-apoptotic FasL and downregulation of anti-apoptotic Bcl-2. Similar observations were discovered for sulfur based compounds suchas allicin and isothiocyanate (PEITC).⁶

We also analyze the transport and accumulation of FCP6 in U-87cells (Fig. 9). The graphs show that FCP6 is transported to the cell interior in an active way. Please note that an experiment carried out on cells fixed in 4% formaldehyde or treated in 4 °C indicates no accumulation of FCP6 in both control compared to cells incubated with FCP6 at 37 °C. We tried to obtain glioma cells mutants resistant to FCP6 to further study FCP6 uptake to the glioma cells, however, we had no success.

We found in literature one example of thiosugar derivative as a TrxR inhibitor. Auranofin (1-Thio-β-D-gluco-pyranosato-tri-ethyl-phosphine gold-2,3,4,6-tetraacetate, other compound with sulfur bridge) is a potent inhibitor of TrxR and is also considered for combined chemotherapy due to its ability to reduce the redox homeostasis in cancer cells.²⁴ The pro-oxidant mechanism of FCP6 is probably also connected with cross-talk between (TrxR) and other antioxidant protein - heme oxygenase-1 (HO-1).^{17,25} Trx-TrxR system can interact with other antioxidant systems - loss of activity of one antioxidant system may activate another to compensate the protection against oxidative stress. For example genetic approaches in various model organisms revealed that the Trx/TrxR system can functionally substitute for the lack of the GSH system and vice versa. HO-1 is an enzyme which catalyzes conversion of intracellular heme into biliverdin, carbon monoxide and free iron. Biliverdin is further reduced by biliverdin reductase into bilirubin which shows anti-oxidative and anti-apoptosis features.^{25,26} In our recent work we found that the use of FCP6 significantly increased the level of HO-1 expression in other cell lines under our study (HeLa)9,27 and confirm this in glioma cell (data not shown). Other reports show that auranofin inhibits TrxR and induced HO-1 expression in myeloma cells, moreover using pharmacological inhibitors of TrxR such as aurothioglucose induces HO-1 expression.²⁵

Similar properties to tested compounds and auranofin show GoPIsugar (P11-thioglucose tetraacetate) also containing sulfur bridge.²⁹ Chemical structures of FCP6, FCP8, Auranofin, as well as, GoPI-sugar are presented on Fig. 10. In conclusion we, herein, propose that FCP6



Fig. 10. Chemical structures of FCP6, FCP8, Auranofin as well as GoPI-sugar. Key motifs with sulfur are marked in yellow.

acts in the cell as an electrophile and forms adducts with thiol-containing proteins (*via* cysteines). This is supported with our previous findings as FCP6 undergoes reaction with GSH.⁹ Most probable FCP6 disrupts the disulfide bond formation and causes protein misfolding and disarm redox homeostasis system based on Trx and GSH. What are the mechanisms underlying FCP6 anticancer activity?

We speculate that a plausible reaction mechanism with thiol-containing proteins might involve intracellular alkalization of the cancer cells cytoplasm and unusual properties of sulfur-containing moieties. Under the discussed conditions, the formation of hemiacetal is occurring with keto function within FCP6 and sulfur containing cellular components like Trx, GSH and so on. The formation of hemithioacetal is one of the reversible reactions known and used in dynamic sulfur chemistry (DSS), connected to drug design and tested for binding, as an example, to a biological receptor. Another mechanism under consideration is beta-elimination of FCP6 resulting in 1-thiosugar and levoglucosenone splitting. 1-thiosugar formed in this manner could reacts with other thiols within the cell according to dynamic sulfur chemistry and therefor disturb cancer cells metabolism^{30,31}.

FCP6 appears to be an attractive sugar derivative class for novel cancer therapeutic development, but further *in vivo* studies regarding their toxicity, activity, bioavailability and stability are needed. Importantly, it is cytotoxic to cancer cells and have sufficient selectivity for cancer over normal cells.¹²

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgment

This work was supported by Grant from The Polish National Science Centre, UMO-2014/15/N/NZ7/02948.

Sample availability

Samples of the compounds FCP6 and FCP8 are available from the Zbigniew J. Witczak.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.126904.

References

- 1. Mitchell SC. Biological Interactions of Sulfur Compounds. CRC Press; 1996.
- Witczak ZJ. Thio sugars: biological relevance as potential new therapeutics. Curr Med Chem. 1999;6(2):165–178.
- Sarnik J, Czubatka-Bieńkowska A, Dziadek J, Witczak ZJ, Popławski T. Thiosugars used as drugs. Postepy Biochem. 2016;62(4):526–534.
- De Gianni E, Fimognari C. Anticancer Mechanism of Sulfur-Containing Compounds. The Enzymes. Elsevier; 2015:167–192. https://doi.org/10.1016/bs.enz.2015.05.003.
- Ilardi EA, Vitaku E, Njardarson JT. Data-mining for sulfur and fluorine: an evaluation of pharmaceuticals to reveal opportunities for drug design and discovery: miniperspective. J Med Chem. 2014;57(7):2832–2842. https://doi.org/10.1021/ jm401375q.
- Witczak ZJ, Culhane JM. Thiosugars: new perspectives regarding availability and potential biochemical and medicinal applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005;69(3):237–244. https://doi.org/10.1007/s00253-005-0156-x.
- Czubatka A, Sarnik J, Lucent D, Blasiak J, Witczak ZJ, Poplawski T. A novel carbohydrate derived compound FCP5 causes DNA strand breaks and oxidative modifications of DNA bases in cancer cells. *Chem Biol Interact.* 2015;227:77–88. https:// doi.org/10.1016/j.cbi.2014.12.023.
- Czubatka-Bienkowska A, Macieja A, Sarnik J, Witczak ZJ, Poplawski T. The oxidative induction of DNA lesions in cancer cells by 5-thio-d-glucose and 6-thio-d-fructopyranose and their genotoxic effects. Part 3. *Bioorg Med Chem Lett.* 2017;27(5):1210–1214. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.01.011.
- Sarnik J, Czubatka-Bienkowska A, Macieja A, Bielski R, Witczak ZJ, Poplawski T. The induction of oxidative stress in cervix carcinoma cells by levoglucosenone derived 4-S-salicyl derivative and (1–4)-S-thio-disaccharides. Part 4. *Bioorg Med Chem Lett.* 2017;27(5):1215–1219. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.01.064.
- Witczak ZJ, Poplawski T, Czubatka A, et al. A potential CARB-pharmacophore for antineoplastic activity: Part 1. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014;24(7):1752–1757. https:// doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.02.036.
- Czubatka-Bieńkowska A, Sarnik J, Macieja A, Galita G, Witczak ZJ, Poplawski T. Thio-functionalized carbohydrate thiosemicarbazones and evaluation of their anticancer activity. *Bioorg Med Chem Lett.* 2017;27(12):2713–2720. https://doi.org/10. 1016/j.bmcl.2017.04.051.
- Witczak ZJ, Sarnik J, Czubatka A, Forma E, Poplawski T. Thio-sugar motif of functional CARB-pharmacophore for antineoplastic activity. Part 2. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014;24(24):5606–5611. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.10.095.
- Witczak ZJ, Kaplon P, Dey PM. Thio-sugars VII. Effect of 3-deoxy-4-S-(beta-D-glucoand beta-D-galactopyranosyl)-4-thiodisaccharides and their sulfoxides and sulfones on the viability and growth of selected murine and human tumor cell lines. *Carbohydr Res.* 2003;338(1):11–18. https://doi.org/10.1016/s0008-6215(02)00394-4.
- Wen PY, Huse JT. 2016 World Health Organization classification of central nervous system tumors. *Continuum (Minneap Minn)*. 2017;23(6, Neuro-oncology):1531–1547. https://doi.org/10.1212/CON.00000000000536.
- Toma M, Witusik-Perkowska M, Szwed M, et al. Eradication of LIG4-deficient glioblastoma cells by the combination of PARP inhibitor and alkylating agent. Oncotarget. 2018;9(96):36867–36877. https://doi.org/10.18632/oncotarget.26409.

- Jo HY, Kim Y, Park HW, et al. The unreliability of MTT assay in the cytotoxic test of primary cultured glioblastoma cells. *Exp Neurobiol.* 2015;24(3):235–245. https://doi. org/10.5607/en.2015.24.3.235.
- Mostert V, Hill KE, Burk RF. Loss of activity of the selenoenzyme thioredoxin reductase causes induction of hepatic heme oxygenase-1. *FEBS Lett.* 2003;541(1–3):85–88.
- Acharya A, Das I, Chandhok D, Saha T. Redox regulation in cancer: a double-edged sword with therapeutic potential. Oxid Med Cell Longev. 2010;3(1):23–34. https:// doi.org/10.4161/oxim.3.1.10095.
- Wang H-C, Hsieh S-C, Yang J-H, Lin S-Y, Sheen L-Y. Diallyl trisulfide induces apoptosis of human basal cell carcinoma cells via endoplasmic reticulum stress and the mitochondrial pathway. *Nutr Cancer*. 2012;64(5):770–780. https://doi.org/10. 1080/01635581.2012.676142.
- Siyo V, Schäfer G, Hunter R, et al. The cytotoxicity of the ajoene analogue BisPMB in WHCO1 oesophageal cancer cells is mediated by CHOP/GADD153. *Molecules*. 2017;22(6) https://doi.org/10.3390/molecules22060892.
- Pfaffenbach KT, Lee AS. The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress. *Curr Opin Cell Biol.* 2011;23(2):150–156. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010. 09.007.
- Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. Cell Death Differ. 2004;11(4):381–389. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401373.
- Wang XZ, Lawson B, Brewer JW, et al. Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Mol Cell Biol.* 1996;16(8):4273–4280. https://doi.org/10.1128/mcb.16.8.4273.

- Gandin V, Fernandes AP, Rigobello MP, et al. Cancer cell death induced by phosphine gold(I) compounds targeting thioredoxin reductase. *Biochem Pharmacol.* 2010;79(2):90–101. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.07.023.
- Raninga PV, Di Trapani G, Vuckovic S, Tonissen KF. Cross-talk between two antioxidants, thioredoxin reductase and heme oxygenase-1, and therapeutic implications for multiple myeloma. *Redox Biol.* 2016;8:175–185. https://doi.org/10.1016/j. redox.2016.01.007.
- Barañano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. PNAS. 2002;99(25):16093–16098. https://doi.org/10.1073/pnas. 252626999.
- 27. Stamford A. Division of Medicinal Chemistry. 391.
- Wang H, Bouzakoura S, de Mey S, et al. Auranofin radiosensitizes tumor cells through targeting thioredoxin reductase and resulting overproduction of reactive oxygen species. *Oncotarget.* 2017;8(22):35728–35742. https://doi.org/10.18632/ oncotarget.16113.
- Jortzik E, Farhadi M, Ahmadi R, et al. Antiglioma activity of GoPI-sugar, a novel gold (I)–phosphole inhibitor: chemical synthesis, mechanistic studies, and effectiveness in vivo. Biochim Biophys Acta (BBA) Proteins Proteomics. 2014;1844(8):1415–1426. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.01.006.
- Persi E, Duran-Frigola M, Damaghi M, et al. Systems analysis of intracellular pH vulnerabilities for cancer therapy. Nat Commun. 2018;9(1):2997.
- Caraballo R, Dong H, Ribeiro JP, et al. Direct STD NMR identification of beta-galactosidase inhibitors from a virtual dynamic hemithioacetal system. Angew Chem Int Ed Engl. 2010;49(3):589–593.

(1-4)-S-thiodisaccharide as anticancer agents. Part 5. Evaluation of anticancer activity and investigation of mechanism of action.

Joanna Sarnik^{a,f}, ArkadiuszGajek^b, Monika Toma^c, Jakub Pawełczyk^d, Sebastian Rykowski^d, Agnieszka Olejniczak^d, Tomasz Sliwinski^c, Roman Bielski^e, Zbigniew J Witczak^{e*} and Tomasz Poplawski^{a*}

a Department of Molecular Genetics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 90-236, Lodz, Poland bDepartment of Medical Biophysics, Institute of Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 90-236 Lodz, Poland.

c Laboratory of Medical Genetics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 90-236 Lodz, Poland

d Institute of Medical Biology, Polish Academy of Sciences, 93-232, Lodz, Poland

e Department of Pharmaceutical Sciences, Nesbitt School of Pharmacy, Wilkes University, Wilkes-Barre, PA 18766, USA

f Department of Rheumatology, Medical University of Lodz, 92-115 Lodz, Poland

Supported Materials

Materials and Methods

1 Chemicals

Most chemicals were obtained from the Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA) and were used without further purification unless otherwise stated. FCP6 and FCP8 were synthetized as previously described[16].

2 Cell culture

To evaluate the biological properties of thiodisaccharides we choose glioma cell lines – U-87 from HPA Culture Collections and cell lines denoted as H6PX and H7PX derived from cancer patients [35,36]. U-87 cell line were cultured inEMEM (EBSS) supplemented with heat-inactivated 10% fetal bovine serum (BII), 1% penicillin-streptomycin mix (Sigma), 2mM Glutamine, 1% Non-Essential Amino Acids (NEAA), 1mM Sodium Pyruvate (NaP). We used Accutase (Sigma)to detached cells from the surface prior to experiments. H6PX and H7PX were cultured in Ham's F-12 medium (Lonza) containing L-glutamine and supplemented with heat-inactivated 10% fetal bovine serum (BII) and 1% penicillin-streptomycin mix (Sigma). Cell lines were maintained in a humidified incubator at 37°C and 5% CO2. Cells were cultured to approximately 70-80% confluence and passaged every 2-3 days.

3 Cytotoxicity assay

Cytotoxicity of tested compounds was evaluated using the Cell Counting Kit-8. Cells were seeded at density 5 x 10^3 per well in a 96-well culture plate.Cells were treated in the range of concentrations from 2200 μ M to 8,6 μ M. After that cells were washed with PBS and incubated with Cell Counting Kit-8 probe. In this method WST-8 is bioreduced by cellular dehydrogenases to orange formazan product. The amount of formazan is proportional to the number of living cells. Absorbance at 450 nm was measured using a microplate reader (BioTek). Number of living cells was measured using formula:(S-B) (K-B) × 100% = viability%, where S is absorbance from the probe, K is absorbance from control and B is blank.

4 Apoptosis assay

Apoptosis was analyzed by staining protocol from FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD) and flow cytometry. FITC Annexin V staining can identify apoptosis as earlier described. FITC Annexin V is used in mix with propidium iodide PI. The membranes of damage or dead cells are permeable to PI. The cells that considered viable are FITC Annexin V and PI negative, samples with cells in early apoptosis with membrane integrity intact are FITC Annexin positive and PI negative, and in end stage of apoptosis or death sample with cells are both FITC Annexin and PI positive. In table 3 (article) results are presented as percentage - viable cells are not stained with FITC and PI and apoptotic are the sum of cells stained with FITC Annexin positive and PI

negative and FITC Annexin and PI positive. Cells were seeded per well on the 6-wells tissue culture plate 24 h prior to the experiment. After the monolayer formation cells were treated for 4 h with IC20 of FCPs. Accutase (Sigma) was used for gentle cells detachment to avoid cell membrane destabilization that could influence experiment results. We used untreated cells stained with both FITC Annexin and PI as negative control. Cells treated with 100µM camptothecin served as positive control. Then we followed FITC Annexin V staining protocol (BD Biosciences) and detected apoptosis using flow cytometry. Data were analyzed on FACSDiva Version 6.2. and Flow Jo software (Tree Star).

5 Clonogenic assay

Clonogenic assay is *in vitro* cell survival assay. It is based on the ability of single cell to formation of a colony. Cells were incubated for 14 h with IC20 of tested compounds. Cells were then collected, counted and seededon cell plates in an amount of 1000 per plates. The plates were incubated for 2 weeks with one medium change. After incubation cells were rinsed with PBS and stained with 6.0% glutaraldehyde and 0.5% crystal violet for 1 h. Crystal violet with glutaraldehyde was rinsed with water and left to dry. After this time planting efficiency was counted for all cell lines. Planting efficiency is the ratio of the number of colonies to the number of cells seeded PE=(no.of colonies formed)/(no.of cells seeded)×100 %[37].

6 Evaluation of reactive oxygen species (ROS) level

To evaluate intracellular oxidative stress we used 2',7'-Dichlorofluorescin diacetate (CM-H2DCFDA). It is a cell-permeable non-fluorescent probe and de-esterified intracellularly and turns to highly fluorescent 2',7'dichlorofluorescein upon oxidation. Cells (50 000 per well) were placed in the 96-wells black plates with transparent bottom and preincubated 30 min in 10 uM concentration with CM-H2DCFDA in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS). After preincubation with CM-H2DCFDA cells were washed with HBSS and incubated 1h with tested compounds in concentration used in DNA damage and repair kinetics. Cells incubated with tert-Butyl hydroperoxide (TBH)(SIGMA) in 100 uM concentration were used as positive control. Cells preincubated with CM-H2DCFDA in HBSS were negative control. After incubation with thiodisaccharides fluorescence, intensity was measured in the microplate reader with an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 528 nm. Results in tested probes were calculated as % of negative control.

7 Assessment of intracellular thiols

Cells were incubated with thiodisaccharides and then collected, washed twice with PBS. Then cells were lysed with a RIPA buffer for 30 min on ice. To quantify the protein content the Bradford procedure was used. Total thiol levels were measured using DTNB titration.10 μ l of cell lysate and 90 μ l of 1 mM DTNB in 6 M guanidine hydrochloride (pH 8.0) were added to 96-wells. After incubation at room temperature for few minutes, the absorbance was measured at 412 nm. Thiol levels were calculated through a calibration curve using GSH as the standard and compared to control probe.

8 Thioredoxin Reductase Assay

The Thioredoxin Reductase Assay Kit (SIGMA) is a colorimetric assay for the determination of thioredoxin reductase activity in cells. It is based on the reduction of 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic) acid (DTNB) with NADPH to 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB). Cells were incubated with FCP6 and FCP8 for 1 h at IC20. Next, they were lysed, and we measured OD 412 immediately and after 4 h to quantify the activity of TrxR. The absorbance was measured at 412 nm.

9 Thioredoxin Reductase activity Probe – TRFS Green

TRFS-Green (LabSpoke) is the used for quantification of TrxR activity in living cells. Cells were planted on 96-wells black plate with clear bottom and treated with IC20 of tested compounds – FCP6 and FCP8 for 1 hour. Working solution (100 μ M) of the TRFS-Green probe was prepared with TE buffer. After washing out the compounds with PBS, cells were incubated in HBSS with TRFS-Green in final concentration 10 μ M for 4h. Cells were imaged under a fluorescent microscope (Ex/Em: 438/538).

10 Protein Synthesis Quantification

The effect of Thiodisaccharides on protein synthesis was determined using Click-IT HPG Alexa Fluor® Protein Synthesis Assay Kit (Life Technologies) according to the protocol. This assay is based on monitoring of incorporation of labelled methionine analogue into protein during synthesis. This methionine analogue is labelled with the alkyne group linked *via* click reaction to a fluorescent azide at the end of protein synthesis. 5 x 10^3 cells were seeded into a black 96-well plate with clear bottom (Corning) and treated with IC20 for 14 h with methionine-free medium (DMEM contains 4,500 mg/L D-glucose, without L-glutamine, sodium pyruvate, L-methionine, and L-cystine Thermo) with labeled methionine. Negative control was incubated 14 h only with medium with labeled methionine. As a positive control, cells were treated with anisomycin for 24 h at 0,2 μ M concentration. Protein synthesis were detected using a Fluorescent Microscope.

11 RNA isolation and qRT-PCR

RNA was isolated from cells incubated with studied compounds at IC20 for 1-2 h using RNeasy Protect Mini Kit (Qiagen) according to instruction. RNA concentration was measured using a Take3 (BioTek) and microplate reader. We analyzed apoptosis-releated genes and ER markers: Reference gene GAPDH and other genes were performed using TaqMan (Life Technologies) and SensiFAST Probe No-ROX One-Step (Bioline). Probes were ran on CFX96 RealTime System (BioRad). The relative gene expression level was determined from six replicates using the 2-ΔΔCt method.

12 Protein isolation

Protein was isolated from cells incubated with studied compounds at IC20 for 1-4 h using RIPA buffer (Sigma) with Protease Inhibitor Cocktail (Sigma). After incubation cells were treated with RIPA and removed by Cell scrapers. Protein concentration was determined by Bradford reagent (Sigma) and Pierce[™] BCA Protein Assay Kit (Thermo) based on BSA standard (Sigma). Protein was used for determination of ER markers by ELISA, Thioredoxin Reductase Assay and Assessment of intracellular thiols

13 ELISA

Protein ER markers were analyzed by ELISA (MyBioSource) according to manufacture protocol. All data are presented relative to untreated control cells \pm SD. All probes all values were in the range of Standard Curve provided by the manufacturer. The absorbance was measured at 450 nm. Cell Based ELISA was used to determine eIF2 alpha. 10 x 10³ U-87 cells were seeded into 96-wells plate 24 h prior experiment and after that treated with IC20 of FCP6 and FCP8. Data were normalized to anti-eIF2 alpha antibody and GAPDH and are presented as relative value to untreated control cells \pm SD. All experiments were performed three times.

14 FCP6 accumulation assay

T6 accumulation by U-87 cells was monitored in MEM medium. Tritiated T6 (activity 2.45 Ci/mmol) was added to the culture medium at a final radioactive concentration of 10 μ Ci/ml (4.08 nmoles of FCP6 per ml). Medium with labeled FCP6 was used to set the U-87 cells test culture (37 °C) as well as two control cultures: living cells at 4 °C and cells fixed with 4% solution of formaldehyde in PBS. During experiment 1 ml cell culture samples (1x10⁶ of cells) were taken at indicated time intervals (0-120 minutes every half an hour) and centrifuged at 1500 RPM, 5 min. Cell pellets were then washed in PBS prior mixing with OptiPhase scintillation fluid (Perkin Elmer). The cell-associated radioactivity was determined by liquid scintillation counting, using a 1450 Microbeta Plus Liquid Scintillation Counter (Perkin Elmer). The results are presented as means ± SD of counts per minute (cpm) from three independent experiments

15 Statistical analysis

Statistical analysis were assessed with Mann-Whitney U test by SigmaPlot 12.3

mgr Joanna Sarnik Katedra Genetyki Molekularnej Uniwersytet Łódzki

30.12.2019r.

Oświadczenie o udziale w publikacjach

Oświadczam, że w pracy **Sarnik J**, Gajek A, Toma M, Pawelczyk J, Rykowski S, Olejniczak A, Sliwinski T, Bielski R, Witczak ZJ, Poplawski T. (1-4)-Thiodisaccharides as anticancer agents. Part 5. Evaluation of anticancer activity and investigation of mechanism of

action. Bioorg Med Chem Lett. 2019 Dec 17:126904. doi: 10.1016/j.bmcl.2019.126904 mój udział polegał na optymalizacji i prowadzeniu prac doświadczalnych w oparciu o techniki spektrofluorymetrczyne, kolorymetryczne, molekularne oraz pisaniu części manuskryptu. Swój udział w artykule oceniam na 63 %.

Oświadczam, że w pracy **Sarnik J**, Czubatka-Bienkowska A, Macieja A, Bielski R, Witczak ZJ, Poplawski T. The induction of oxidative stress in cervix carcinoma cells by levoglucosenone derived 4-S-salicyl derivative and (1-4)-S-thio-disaccharides. Part 4. Bioorg Med Chem Lett. 2017 Mar 1;27(5):1215-1219. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.01.064. mój udział polegał na optymalizacji i prowadzeniu prac doświadczalnych w oparciu o techniki spektrofluorymetrczyne, kolorymetryczne, molekularne (ekspresja genów, test

konformacyjny) i testu kometowego oraz pisaniu części manuskryptu. Swój udział w artykule oceniam na 72 %.

Oświadczam, że w pracy **Sarnik J**, Czubatka-Bieńkowska A, Dziadek J, Witczak ZJ, Popławski T. Thiosugars used as drugs [Article in Polish] Postępy Biochem. 2016;62(4):526-534. mój udział polegał na korekcie i pisaniu części manuskryptu. Swój udział w artykule oceniam na 72 %.

Oświadczam, że w pracy Witczak ZJ, Sarnik J, Czubatka A, Forma E, Poplawski T. Thio-sugar motif of functional CARB-pharmacophore for antineoplastic activity. Part 2. Bioorg Med Chem Lett. 2014 Dec 15;24(24):5606-5611. doi: 10.1016/j.bmcl.2014.10.095

2720 mój udział polegał na optymalizacji i prowadzeniu prac doświadczalnych w oparciu o techniki kolorymteryczne i cytometryczne oraz pisaniu części manuskryptu. Swój udział w artykule oceniam na 75 %

mgr Joanna Sarnik

dr hab. Tomasz Popławski prof. UŁ Katedra Genetyki Molekularnej Uniwersytet Łódzki

30.12.2019r.

Oświadczenie o udziale w publikacjach

Oświadczam, że w pracy Sarnik J, Gajek A, Toma M, Pawelczyk J, Rykowski S, Olejniczak A, Sliwinski T, Bielski R, Witczak ZJ, Poplawski T. (1-4)-Thiodisaccharides as anticancer agents. Part 5. Evaluation of anticancer activity and investigation of mechanism of

action. Bioorg Med Chem Lett. 2019 Dec 17:126904. doi: 10.1016/j.bmcl.2019.126904 mój udział polegał na koordynowaniu pracy doświadczalnej oraz pisaniu części manuskryptu. Swój udział w artykule oceniam na 10%.

Oświadczam, że w pracy Sarnik J, Czubatka-Bienkowska A, Macieja A, Bielski R, Witczak ZJ, Poplawski T. The induction of oxidative stress in cervix carcinoma cells by levoglucosenone derived 4-S-salicyl derivative and (1-4)-S-thio-disaccharides. Part 4. Bioorg Med Chem Lett. 2017 Mar 1;27(5):1215-1219. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.01.064. mój udział polegał na koordynowaniu pracy doświadczalnej oraz pisaniu części manuskryptu. Swój udział w artykule oceniam na 10 %.

Oświadczam, że w pracy Sarnik J, Czubatka-Bieńkowska A, Dziadek J, Witczak ZJ, Popławski T. Thiosugars used as drugs [Article in Polish] Postępy Biochem. 2016;62(4):526-534. mój udział polegał na koordynowaniu pracy doświadczalnej oraz pisaniu i korekcie części manuskryptu. Swój udział w artykule oceniam na 10 %

Oświadczam, że w pracy Witczak ZJ, Sarnik J, Czubatka A, Forma E, Poplawski T. Thio-sugar motif of functional CARB-pharmacophore for antineoplastic activity. Part 2. Bioorg Med Chem Lett. 2014 Dec 15;24(24):5606-5611. doi: 10.1016/j.bmcl.2014.10.095 2720 mój udział polegał na koordynowaniu pracy doświadczalnej oraz pisaniu i korekcie części manuskryptu. Swój udział w artykule oceniam na 10 %

10pen Penh dr hab. Tomasz Popławski prof. UŁ
dr hab. Zbigniew J. Witczak Department of Pharmaceutical Sciences, Nesbitt School of Pharmacy, Wilkes University, Wilkes-Barre, PA 18766, USA

30. 12.2019r.

Oświadczenie o udziale w publikacjach

Oświadczam, że w pracy Sarnik J, Gajek A, Toma M, Pawelczyk J, Rykowski S, Olejniczak A, Sliwinski T, Bielski R, Witczak ZJ, Poplawski T. (1-4)-Thiodisaccharides as anticancer agents. Part 5. Evaluation of anticancer activity and investigation of mechanism of action. Bioorg Med Chem Lett. 2019 Dec 17:126904. doi: 10.1016/j.bmcl.2019.126904 mój udział polegał na opracowaniu i koordynowaniu syntezy badanych związków, opisaniu ich charakterystyki chemicznej oraz pisaniu części manuskryptu. Swój udział w artykule oceniam na 10 %.

Oświadczam, że w pracy Sarnik J, Czubatka-Bienkowska A, Macieja A, Bielski R, Witczak ZJ, Poplawski T. The induction of oxidative stress in cervix carcinoma cells by levoglucosenone derived 4-S-salicyl derivative and (1-4)-S-thio-disaccharides. Part 4. Bioorg Med Chem Lett. 2017 Mar 1;27(5):1215-1219. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.01.064. mój udział polegał na opracowaniu i koordynowaniu syntezy badanych związków, opisaniu ich

charakterystyki chemicznej oraz pisaniu części manuskryptu. Swój udział w artykule oceniam na 10 %.

Oświadczam, że w pracy Sarnik J, Czubatka-Bieńkowska A, Dziadek J, Witczak ZJ, Popławski T. Thiosugars used as drugs [Article in Polish] Postępy Biochem. 2016;62(4):526-534. mój udział polegał na korekcie i pisaniu części manuskryptu Swój udział w artykule oceniam na 10 %.

Oświadczam, że w pracy Witczak ZJ, Sarnik J, Czubatka A, Forma E, Poplawski T. Thio-sugar motif of functional CARB-pharmacophore for antineoplastic activity. Part 2. Bioorg Med Chem Lett. 2014 Dec 15;24(24):5606-5611. doi: 10.1016/j.bmcl.2014.10.095 2720 mój udział polegał na opracowaniu i koordynowaniu syntezy badanych związków, ich

charakterystyce chemicznej oraz korekcie językowej manuskryptu. Swój udział w artykule oceniam na 10 %

dr hab. Zbigniew J. Witczak

Dr Roman Bielski Department of Pharmaceutical Sciences, Nesbitt School of Pharmacy, Wilkes University, Wilkes-Barre, PA 18766, USA

Oświadczenie o udziale w publikacjach

Oświadczam, że w pracy Sarnik J, Gajek A, Toma M, Pawelczyk J, Rykowski S,

. m.

30. 12.2019r.

Olejniczak A, Sliwinski T, **Bielski R**, Witczak ZJ, Poplawski T. (1-4)-Thiodisaccharides as anticancer agents. Part 5. Evaluation of anticancer activity and investigation of mechanism of action. Bioorg Med Chem Lett. 2019 Dec 17:126904. doi: 10.1016/j.bmcl.2019.126904 mój udział polegał na opracowaniu syntezy 4 badanych związków i opisaniu ich charakterystyki chemicznej. Swój udział w artykule oceniam na 2%.

Oświadczam, że w pracy Sarnik J, Czubatka-Bienkowska A, Macieja A, **Bielski R**, Witczak ZJ, Poplawski T. The induction of oxidative stress in cervix carcinoma cells by levoglucosenone derived 4-S-salicyl derivative and (1-4)-S-thio-disaccharides. Part 4. Bioorg Med Chem Lett. 2017 Mar 1;27(5):1215-1219. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.01.064 mój udział polegał na opracowaniu syntezy 4 badanych związków i opisaniu ich charakterystyki

chemicznej. Swój udział w artykule oceniam na 2%

Dr Roman Bielski



Dr Anna Czubatka-Bieńkowska Katedra Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego

30.12.2019r.

Oświadczenie o udziale w publikacjach

Oświadczam, że w pracy Sarnik J, **Czubatka-Bienkowska A**, Macieja A, Bielski R, Witczak ZJ, Poplawski T. The induction of oxidative stress in cervix carcinoma cells by levoglucosenone derived 4-S-salicyl derivative and (1-4)-S-thio-disaccharides. Part 4. Bioorg

Med Chem Lett. 2017 Mar 1;27(5):1215-1219. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.01.064. 1214 mój udział polegał na wykonaniu i opracowaniu części eksperymentów dotyczących analizy ekspresji genów. Swój udział w artykule oceniam na 3 %

Oświadczam, że w pracy Sarnik J, **Czubatka-Bieńkowska A**, Dziadek J, Witczak ZJ, Popławski T. Thiosugars used as drugs [Article in Polish] Postępy Biochem. 2016;62(4):526-534. mój udział polegał na pisaniu części manuskryptu. Swój udział w artykule oceniam na 3 %

Oświadczam, że w pracy Witczak ZJ, Sarnik J, Czubatka A, Forma E, Poplawski T. Thio-sugar motif of functional CARB-pharmacophore for antineoplastic activity. Part 2.

Bioorg Med Chem Lett. 2014 Dec 15;24(24):5606-5611. doi: 10.1016/j.bmcl.2014.10.095 2720 mój udział polegał na wykonaniu części eksperymentów z wykorzystaniem CCK-8. Swój udział w artykule oceniam na 3 %

Culothe - biertion Aus

Dr Anna Czubatka-Bieńkowska



Prof. dr hab. Jarosław Dziadek Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk

30.12.2019r.

Oświadczenie o udziale w publikacjach

5

Oświadczam, że w pracy Sarnik J, Czubatka-Bieńkowska A, **Dziadek J**, Witczak ZJ, Popławski T. Thiosugars used as drugs [Article in Polish] Postępy Biochem. 2016;62(4):526-534. mój udział polegał na pisaniu i korekcie części manuskryptu. Swój udział w artykule

oceniam na 5%





Dr Jakub Pawełczyk Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk

Oświadczenie o udziale w publikacjach

Oświadczam, że w pracy Sarnik J, Gajek A, Toma M, **Pawelczyk J**, Rykowski S, Olejniczak A, Sliwinski T, Bielski R, Witczak ZJ, Poplawski T. (1-4)-Thiodisaccharides as anticancer agents. Part 5. Evaluation of anticancer activity and investigation of mechanism of

action. Bioorg Med Chem Lett. 2019 Dec 17:126904. doi: 10.1016/j.bmcl.2019.126904 mój udział polegał na przygotowaniu części eksperymentów i opracowaniu wyników dotyczących akumulacji badanego związku w komórkach nowotworowych z wykorzystaniem 1450 Microbeta Plus Liquid Scintillation Counter . Swój udział w artykule oceniam na 3 %.

Dr Jakub Pawełczyk

30.12.2019r.

S.



Mgr inż. Sebastian Rykowski Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk

30.12.2019r.

Ser.

Oświadczenie o udziale w publikacjach

Oświadczam, że w pracy Sarnik J, Gajek A, Toma M, Pawelczyk J, **Rykowski S**, Olejniczak A, Sliwinski T, Bielski R, Witczak ZJ, Poplawski T. (1-4)-Thiodisaccharides as anticancer agents. Part 5. Evaluation of anticancer activity and investigation of mechanism of

action. Bioorg Med Chem Lett. 2019 Dec 17:126904. doi: 10.1016/j.bmcl.2019.126904 mój udział polegał na przygotowaniu części eksperymentów dotyczących wyznakowania badanego związku ³H. Swój udział w artykule oceniam na 3 %.

Seharian Rylowyhu

Mgr inż. Sebastian Rykowski



Dr hab. Agnieszka Olejniczak Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk

30.12.2019r.

Oświadczenie o udziale w publikacjach

Oświadczam, że w pracy Sarnik J, Gajek A, Toma M, Pawelczyk J, Rykowski S, **Olejniczak A**, Sliwinski T, Bielski R, Witczak ZJ, Poplawski T. (1-4)-Thiodisaccharides as anticancer agents. Part 5. Evaluation of anticancer activity and investigation of mechanism of

action. Bioorg Med Chem Lett. 2019 Dec 17:126904. doi: 10.1016/j.bmcl.2019.126904 mój udział polegał na zaprojektowaniu procesu wyznakowania badanego związku ³H. Swój udział w artykule oceniam na 3 %.

Dr hab. Agnieszka Olejniczak



Mgr Anna Macieja Katedra Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego

30. 12.2019r.

Oświadczenie o udziale w publikacjach

Oświadczam, że w pracy Sarnik J, Czubatka-Bienkowska A, Macieja A, Bielski R, Witczak ZJ, Poplawski T. The induction of oxidative stress in cervix carcinoma cells by levoglucosenone derived 4-S-salicyl derivative and (1-4)-S-thio-disaccharides. Part 4. Bioorg

Med Chem Lett. 2017 Mar 1;27(5):1215-1219. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.01.064. 1214 mój udział polegał na wykonaniu i opracowaniu części eksperymentów dotyczących testu kometowego. Swój udział w artykule oceniam na 3 %

, tone

et. Maciefs Mgr Anna Macieja



Prof. dr hab. Tomasz Śliwiński Pracowania Genetyki Medycznej Uniwersytetu Łódzkiego

30.12.2019r.

Oświadczenie o udziale w publikacjach

Oświadczam, że w pracy Sarnik J, Gajek A, Toma M, Pawelczyk J, Rykowski S, Olejniczak A, Sliwinski T, Bielski R, Witczak ZJ, Poplawski T. (1-4)-Thiodisaccharides as anticancer agents. Part 5. Evaluation of anticancer activity and investigation of mechanism of

action. Bioorg Med Chem Lett. 2019 Dec 17:126904. doi: 10.1016/j.bmcl.2019.126904 mój udział polegał na opracowaniu charakterystyki wyprowadzonych linii komórkowych H6PX i H7PX. Swój udział w artykule oceniam na 2%.

1 .



Prof. dr hab. Tomasz Śliwiński



Dr Arkadiusz Gajek Katedra Biofizyki Medycznej Uniwersytetu Łódzkiego

30. 12.2019r.

Oświadczenie o udziale w publikacjach

Oświadczam, że w pracy Sarnik J, Gajek A, Toma M, Pawelczyk J, Rykowski S, Olejniczak A, Sliwinski T, Bielski R, Witczak ZJ, Poplawski T. (1-4)-Thiodisaccharides as

anticancer agents. Part 5. Evaluation of anticancer activity and investigation of mechanism of action. Bioorg Med Chem Lett. 2019 Dec 17:126904. doi: 10.1016/j.bmcl.2019.126904 mój udział polegał na przygotowaniu części eksperymentu z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego przy oznaczaniu metodami Click-IT HPG Alexa Fluor® Protein Synthesis Assay Kit oraz TRFS-GREEN. Swój udział w artykule oceniam na 2 %.

Adadius Cojet

Dr Arkadiusz Gajek



Mgr Monika Toma Katedra Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego

30. 12.2019r.

P.

Oświadczenie o udziale w publikacjach

Oświadczam, że w pracy Sarnik J, Gajek A, Toma M, Pawelczyk J, Rykowski S, Olejniczak A, Sliwinski T, Bielski R, Witczak ZJ, Poplawski T. (1-4)-Thiodisaccharides as

anticancer agents. Part 5. Evaluation of anticancer activity and investigation of mechanism of action. Bioorg Med Chem Lett. 2019 Dec 17:126904. doi: 10.1016/j.bmcl.2019.126904 mój udział polegał na przygotowaniu hodowli komórkowych H6PX i H7PX. Swój udział w artykule oceniam na 2 %.

100

Monike Tomes

mgr Monika Toma



Dr Ewa Forma Katedra Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego

Oświadczenie o udziale w publikacjach

6.

Oświadczam, że w pracy Witczak ZJ, Sarnik J, Czubatka A, Forma E, Poplawski T. Thio-sugar motif of functional CARB-pharmacophore for antineoplastic activity. Part 2. Bioorg Med Chem Lett. 2014 Dec 15;24(24):5606-5611. doi: 10.1016/j.bmcl.2014.10.095

2720 mój udział polegał na przygotowaniu hodowli komórkowych PNT2. Swój udział w artykule oceniam na 2 %.

15.

, tone

Ewo Formed

30. 12.2019r.

Dr Ewa Forma

