

EFFECT OF GLUCOSE STARVATION ON CELL VIABILITY PARAMETERS IN A549 AND BEAS-2B CELL LINES

B.G. ÇETINER¹, M.Y. TERZI^{1,2*}

¹ Department of Molecular Biochemistry and Genetics, Graduate School of Health Sciences, Hatay Mustafa Kemal University, Hatay 31060, Turkey

² Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Hatay Mustafa Kemal University, Hatay 31060, Turkey

E-mail: menderesyusufferzi@gmail.com

Cancer cells are metabolically altered cells characterized by higher glucose uptake. Understanding cancer cells is vital in cancer therapy. We aimed to analyze glucose starvation effect on cell viability parameters in healthy (BEAS-2B) and cancer (A549) cells. We analyzed mTOR, p21, caspase-3, beclin-1, ATG-12 mRNA levels in cells after 8-h and 24-h starvations. We also counted senescent cells post-starvation. Starvation decreased cell viability in both cell types whereas prolonged starvation kept reducing cell viability just in A549 cells. Along with elevated p21 mRNA levels, we detected more senescent cells in A549 than in BEAS-2B after starvation. Increased mTOR expression supported senescence profile in cancer cells at 8-hour-starvation unlike healthy cells. Autophagy marker expression increased after-starvation in both cell lines except reduction in BEAS-2B cells after 8-h-starvation. Caspase-3 expression did not change in BEAS-2B cells while increased in A549 cells at 8-hour-starvation. As to 24-hour-starvation, caspase-3 was upregulated in both cells, however, it was higher in cancer cells compared to healthy cells. We suggest that cell viability parameters of healthy and cancer cells were negatively affected by prolonging glucose starvation. Our results demonstrated that glucose starvation had more negative effects on cancer cells than healthy cells.

Key words: apoptosis, autophagy, cancer cell, cell viability, glucose starvation, senescence.

ВПЛИВ ГЛЮКОЗНОГО ГОЛОДУВАННЯ НА ПАРАМЕТРИ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ КЛІТИН З КЛІТИННИХ ЛІНІЙ А549 ТА БЕАС-2В

Ракові клітини — це клітини зі зміненим метаболізмом, які характеризуються високим рівнем споживання глюкози. Розуміння ракових клітин є надзвичайно важливим для лікування раку. Метою нашого дослідження було проаналізувати вплив глюкозного голодування на параметри життєздатності здорових (BEAS-2B) та ракових (A549) клітин. Ми проаналізували рівні мРНК mTOR, p21, каспази-3, бекліну-1, ATG-12 в клітинах після голодування

впродовж 8 та 24 год і підраховували кількість старіючих клітин. Голодування знизило життєздатність обох типів клітин, у той час як тривале голодування продовжувало знижувати життєздатність лише клітин лінії А549. Після голодування ми виявили підвищені рівні мРНК p21, а також більше старіючих клітин у лінії А549, ніж BEAS-2B. На відміну від здорових клітин, підвищений рівень експресії mTOR сприяв профілю старіння ракових клітин при голодуванні впродовж 8 год. Рівень експресії маркера аутофагії підвищився після голодування в обох клітинних лініях, окрім зниження у клітинах BEAS-2B після голодування впродовж 8 год. Рівень експресії каспази-3 не змінився в клітинах BEAS-2B, однак підвищився в клітинах А549 при голодуванні впродовж 8 год. Що стосується голодування впродовж 24 год, спостерігалось підвищення регуляції каспази-3 в обох типах клітин, однак, вищим воно було в ракових клітинах порівняно зі здоровими. Ми припускаємо, що триваліше глюкозне голодування мало негативний вплив на параметри життєздатності здорових і ракових клітин. Наші результати продемонстрували, що глюкозне голодування мало більш негативний вплив на ракові клітини, ніж на здорові.

Ключові слова: апоптоз, аутофагія, ракова клітина, життєздатність клітин, глюкозне голодування, старіння.

REFERENCES

- Allavena G, Boyd C, KS Oo et al. (2016) Suppressed translation and ULK1 degradation as potential mechanisms of autophagy limitation under prolonged starvation. *Autophagy* 12:2085–2097. doi: 10.1080/15548627.2016.1226733
- Aykin-Burns N, IM Ahmad Y Zhu et al. (2009) Increased levels of superoxide and H₂O₂ mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation *Biochem J* 418:29–37. doi: 10.1042/BJ20081258
- Ben-Porath I, Weinberg RA. (2005) The signals and pathways activating cellular senescence *Int J Biochem Cell Biol* 37:961–976. doi: 10.1016/j.biocel.2004.10.013
- Braun F, Bertin-Ciftci J, Gallouet AS et al. (2011) Serum-nutrient starvation induces cell death mediated by Bax and Puma that is counteracted by p21 and unmasked by Bcl-x(L) inhibition. *PLoS One* 6:e23577. doi: 10.1371/journal.pone.0023577
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I et al. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68:394–424. doi: 10.3322/caac.21492
- Danhier P, Banski P, Payen VL et al. (2017) Cancer metabolism in space and time: Beyond the Warburg effect. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1858:556–572. doi: 10.1016/j.bbabi.2017.02.001

- Di X, Shiu RP, Newsham IF et al. (2009) Apoptosis, autophagy, accelerated senescence and reactive oxygen in the response of human breast tumor cells to adriamycin *Biochem Pharmacol* 77:1139–1150. doi: 10.1016/j.bcp.2008.12.016
- Du C, Fang M, Li Y et al. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102:33–42
- Endo H, Owada S, Inagaki Y et al. (2018) Glucose starvation induces LKB1-AMPK-mediated MMP-9 expression in cancer cells *Sci Rep* 8:10122. doi: 10.1038/s41598-018-28074-w
- He N, Kim N, Jeong E et al. (2016) Glucose starvation induces mutation and lineage-dependent adaptive responses in a large collection of cancer cell lines *Int J Oncol* 48:67–72. doi: 10.3892/ijo.2015.3242
- Jangamreddy JR, Jain MV, Hallbeck AL et al. (2015) Glucose starvation-mediated inhibition of salinomycin induced autophagy amplifies cancer cell specific cell death *Oncotarget* 6:10134–10145. doi: 10.18632/oncotarget.3548
- Khan MR, Xiang S, Song Z et al. (2017) The p53-inducible long noncoding RNA TRINGS protects cancer cells from necrosis under glucose starvation. *EMBO J* 36:3483–3500. doi: 10.15252/emboj.201696239
- Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV (2011) Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism *Nat Rev Cancer* 11:325–337. doi: 10.1038/nrc3038
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Harris AL et al. (2006) Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma *Cancer Res* 66:632–637. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3260
- Lee C, Raffaghello L, Brandhorst S et al. (2012) Fasting cycles retard growth of tumors and sensitize a range of cancer cell types to chemotherapy *Sci Transl Med* 4:124ra127. doi: 10.1126/scitranslmed.3003293
- Liu C, DeRoo EP, Stecyk C et al. (2015) Impaired autophagy in mouse embryonic fibroblasts null for Kruppel-like Factor 4 promotes DNA damage and increases apoptosis upon serum starvation *Mol Cancer* 14:101. doi: 10.1186/s12943-015-0373-6
- Ma L, Wei J, Wan J et al. (2019) Low glucose and metformin-induced apoptosis of human ovarian cancer cells is connected to ASK1 via mitochondrial and endoplasmic reticulum stress-associated pathways *J Exp Clin Cancer Res* 38:77. doi: 10.1186/s13046-019-1090-6
- Macip S, Igarashi M, Fang L et al. (2002) Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence *EMBO J* 21:2180–2188. doi: 10.1093/emboj/21.9.2180
- Mendivil-Perez M, Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. (2013) Glucose starvation induces apoptosis in a model of acute T leukemia dependent on caspase-3 and apoptosis-inducing factor: a therapeutic strategy *Nutr Cancer* 65:99–109. doi: 10.1080/01635581.2013.741751
- Neufeld TP. (2010) TOR-dependent control of autophagy: biting the hand that feeds *Curr Opin Cell Biol* 22:157–168. doi: 10.1016/j.ceb.2009.11.005
- Papinski D, Schuschnig M, Reiter W et al. (2014) Early steps in autophagy depend on direct phosphorylation of Atg9 by the Atg1 kinase *Mol Cell* 53:471–483. doi: 10.1016/j.molcel.2013.12.011
- Priebe A, Tan L, Wahl H et al. (2011) Glucose deprivation activates AMPK and induces cell death through modulation of Akt in ovarian cancer cells *Gynecol Oncol* 122:389–395. doi: 10.1016/j.ygyno.2011.04.024
- Raut GK, Chakrabarti M, Pamarthy D et al. (2019) Glucose starvation-induced oxidative stress causes mitochondrial dysfunction and apoptosis via Prohibitin 1 upregulation in human breast cancer cells *Free Radic Biol Med* 145:428–441.
- Shin HJ, Kim H, Oh S et al. (2016) AMPK-SKP2-CARM1 signalling cascade in transcriptional regulation of autophagy *Nature* 534:553–557. doi: 10.1038/nature18014
- Suzuki H, Asakawa A, Amitani H et al. (2013) Cancer cachexia pathophysiology and translational aspect of herbal medicine *Jpn J Clin Oncol* 43:695–705. doi: 10.1093/jjco/hyt075
- Terzi MY, Izmirlir M, Gogebakan B. (2016) The cell fate: senescence or quiescence *Mol Biol Rep* 43:1213–1220. doi: 10.1007/s11033-016-4065-0
- Wang L, Shang Z, Zhou Y et al. (2018) Autophagy mediates glucose starvation-induced glioblastoma cell quiescence and chemoresistance through coordinating cell metabolism, cell cycle, and survival *Cell Death Dis* 9:213. doi: 10.1038/s41419-017-0242-x
- Wang S, Mao Y, Xi S et al. (2017) Nutrient Starvation Sensitizes Human Ovarian Cancer SKOV3 Cells to BH3 Mimetic via Modulation of Mitochondrial Dynamics *Anat Rec (Hoboken)* 300:326–339. doi: 10.1002/ar.23454
- Yurube T, Buchser WJ, Moon HJ et al. (2019) Serum and nutrient deprivation increase autophagic flux in intervertebral disc annulus fibrosus cells: an in vitro experimental study *Eur Spine J* 28:993–1004. doi: 10.1007/s00586-019-05910-9
- Zhan J, Easton JB, Huang S et al. (2007) Negative regulation of ASK1 by p21Cip1 involves a small domain that includes Serine 98 that is phosphorylated by ASK1 in vivo *Mol Cell Biol* 27:3530–3541. doi: 10.1128/MCB.00086-06
- Zhang Y, Ren S, Liu Y et al. (2017) Inhibition of Starvation-Triggered Endoplasmic Reticulum Stress, Autophagy, and Apoptosis in ARPE-19 Cells by Taurine through Modulating the Expression of Calpain-1 and Calpain-2 *Int J Mol Sci* 18. doi: 10.3390/ijms18102146

Received May 13, 2020
 Received September 18, 2020
 Accepted January 18, 2022