

Wpływ wyciszenia ekspresji genów kodujących enzymy glikolityczne na regulację replikacji DNA w ludzkich fibroblastach

Aleksandra Konieczna

Rozwój komórki eukariotycznej odbywa się poprzez kolejne, zachodzące po sobie etapy cyklu komórkowego, podczas którego dochodzi do jej wzrostu, powielenia materiału genetycznego oraz podziału na dwie komórki potomne. Wiele czynników środowiskowych, jak również wewnątrzkomórkowych decyduje o tym, czy komórka przejdzie przez kolejne fazy cyklu komórkowego, czy też wejdzie w stan spoczynku. Przebieg cyklu zależy również od prawidłowego funkcjonowania procesów metabolicznych, w tym centralnego metabolizmu węgla (ang. *central carbon metabolism*, CCM) oraz replikacji DNA. Jednym z podstawowych procesów CCM jest glikoliza. Stanowi ona główną drogę przemian glukozy w komórkach, prowadzącą do jej przekształcenia w pirogronian. Szlak glikolityczny jest nie tylko źródłem energii komórkowej, ale także związków pośrednich wykorzystywanych w pozostałych szlakach metabolicznych. Do niedawna uważano, że metabolizm węgla oraz replikacja DNA są ze sobą powiązane raczej w sposób pośredni, głównie poprzez dostarczaną energię, niezbędną do powielenia materiału genetycznego, jak i wytwarzanie prekursorów substratów w postaci deoksyrybonukleotydów. Jednak najnowsze wyniki badań przeprowadzonych na organizmach prokariotycznych sugerują istnienie dużo bardziej złożonych zależności pomiędzy tymi dwoma procesami. Natomiast w przypadku komórek eukariotycznych brakuje danych literaturowych na ten temat, a nawet jeśli się pojawiają, to w większości pochodzą z prac nad komórkami nowotworowymi lub pojedynczymi enzymami glikolitycznymi. Dlatego też celem tej pracy było przeprowadzenie analiz obejmujących cały szlak, a nie tylko jego wybrane enzymy, w zdrowych ludzkich komórkach. Swoje badania przeprowadziłam na fibroblastach linii HDFa reprezentujących zdrowe, aktywnie dzielące się komórki, nie mające cech transformacji.

Do wyciszenia ekspresji poszczególnych genów kodujących enzymy zaangażowane w reakcje szlaku glikolizy wykorzystałam siRNA. Następnie po wyciszeniu ekspresji genów przeprowadziłam analizy proliferacji komórkowej, a także przebiegu cyklu komórkowego ze szczególnym uwzględnieniem wejścia komórek w fazę replikacji DNA. Sprawdziłam również poziom syntezy DNA w badanych komórkach. Wyciszenie ekspresji genu *GAPDH*

kodującego dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego skutkowało obniżeniem o około połowę liczby komórek. Poza tym powodowało znaczny spadek poziomu syntezy DNA oraz ilości komórek w fazie S. Podobny efekt uzyskałam po wyciszeniu ekspresji genu *HK2* kodującego heksokinazę 2. Analiza cyklu komórkowego wykazała także około 20-30% obniżenie ilości komórek w fazie replikacji DNA po wyciszeniu ekspresji genów *PFKM*, *TPI*, oraz *LDHA*, przy czym liczba komórek oraz poziom syntezy DNA spadał tylko o około 15%. Z kolei wyciszenie *ENO1* kodującego α -enolazę opóźniało wejście komórek w fazę S o około 2 h w stosunku do komórek kontrolnych. Wpływało również negatywnie na liczbę fibroblastów oraz poziom syntezy DNA. Pomimo istnienia danych literaturowych o negatywnym wpływie obniżenia aktywności niemal każdego enzymu szlaku glikolizy na proliferację oraz żywotność komórek nowotworowych, w przypadku zdrowych komórek fibroblastów nie zaobserwowałam znacznego efektu wyciszenia ekspresji genów *ALDOA*, *PGK1*, *PGAM1* oraz *PKM* na przebieg cyklu komórkowego oraz syntezy DNA. Pośród proponowanych mechanizmów powiązania centralnego metabolizmu węgla z replikacją DNA wskazuje się także na możliwą rolę metabolitów, których zaburzony poziom spowodowany zmianami w aktywności enzymów metabolizmu węgla mógłby prowadzić do zmian w przebiegu syntezy DNA. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, że w przypadku suplementacji pożywki fosfoenolopirogronianem w komórkach z wyciszoną ekspresją *ENO1* dochodziło do nieznacznego zwiększenia wydajności syntezy DNA w stosunku do komórek kontrolnych, nietraktowanych siRNA. Natomiast dodanie pirogronianu w nieco wyższych stężeniach powodowało efekt odwrotny, niezależnie od rodzaju wyciszanego genu.

Podsumowując, wyniki mojej pracy sugerują istnienie bardziej skomplikowanych zależności pomiędzy podstawowymi procesami zachodzącymi we wszystkich komórkach, jakimi są glikoliza i replikacja DNA, niż do tej pory zakładano. Ponadto jest to pierwsza tak kompleksowa analiza skutków wyciszenia genów glikolitycznych i ich ewentualnego wpływu na cykl komórkowy, w tym replikację DNA, w zdrowych komórkach ludzkich. Dane te pozwalają nie tylko poszerzyć naszą wiedzę na temat funkcjonalnego powiązania obu tych procesów w komórce eukariotycznej, ale także mogą w przyszłości umożliwić modelowanie mechanizmów regulacyjnych, czy przewidywać ewentualne skutki działania różnych czynników wpływających na funkcjonowanie danego organizmu. Ponadto mogą one być istotne przy planowaniu potencjalnych terapii antynowotworowych, ukierunkowanych na zahamowanie procesu glikolizy.