

Korelacje pomiędzy ekspresją genów kodujących enzymy cyklu Krebsa a kontrolą replikacji DNA w komórkach ludzkich

Aneta Wieczorek

Powielanie materiału genetycznego jest kluczowym procesem biologicznym, niezbędnym do życia wszystkich organizmów żywych. W komórkach eukariotycznych replikacja DNA zachodzi podczas fazy S interfazy. Podczas tego procesu podwójna nić DNA ulega rozpleceniu, dzięki obecności helikazy, która rozrywa wiązania wodorowe między matrycowymi nićmi DNA. Stabilność chromosomu jest zapewniona dzięki topoizomerazie, która moduluje strukturę przestrzenną cząsteczek DNA. Aktywowana przez helikazę primaza syntezuje na obu niciach DNA krótkie (11 \pm 1 nukleotydów) komplementarne odcinki starterowego RNA (startery). Polimeraza DNA do pojedynczych nici (nici matrycowych), na drodze komplementarności, dobudowuje nowe nici. Po zakończeniu wydłużania nici nukleaza DNA usuwa startery, ligaza DNA łączy fragmenty Okazaki oraz katalizuje tworzenie wiązań fosfodiesterowych. W miejscu usuniętych starterów polimeraza DNA uzupełnia powstałe luki. Nieusunięte błędy podczas replikacji często skutkują zaburzeniami funkcji komórek, które u człowieka mogą prowadzić do powstawania nowotworów.

Centralny metabolizm węgla (z ang. central carbon metabolism, CCM) jest szeregiem przemian, dzięki którym uzyskiwana jest energia niezbędna do rozwoju i rozmnażania komórek. Do szlaków CCM zaliczamy: glikolizę, cykl Krebsa, glukoneogenezę, cykl kwasów pentozofosforanowych. Kluczową rolą centralnego metabolizmu węgla jest wytworzenie energii, głównie w formie ATP (łącznie 12 cząsteczek z jednej cząsteczki glukozy) oraz czynników redukujących. Cykl Krebsa, zwany także cyklem kwasu cytrynowego lub cyklem kwasów trójkarboksylowych, jest serią reakcji chemicznych mających na celu generowanie energii poprzez utlenianie octanu do dwutlenku węgla oraz dostarczania czynników redukujących. Cykl kwasu cytrynowego przebiega w macierzy (matrix) mitochondrialnej eukariontów. Substratem cyklu jest acetylokoenzym A (acetylo-CoA, czynny octan), który po połączeniu ze szczawiooctanem daje cytrynian (koenzym A odłącza się), a następnie w wyniku kolejnych reakcji izomeryzacji, dehydrogenacji, hydratacji, dehydratacji i dekarboksylacji zostaje utleniony do dwóch cząsteczek dwutlenku węgla. Jednocześnie regeneruje się cząsteczka szczawiooctanu. W wyniku utleniania z jednej reszty octanu

powstają dodatkowo 3 cząsteczki NAD^+ i jedna FAD^+ oraz GTP (guanozynotryfosforan, równoważnik ATP).

Najnowsze badania na modelu bakteryjnym *Bacillus subtilis* wskazują na istnienie bezpośredniego związku między centralnym metabolizmem węgla a regulacją replikacji DNA. Zaobserwowano, iż temperaturo-wrażliwość mutantów replikacyjnych może zostać zniesiona poprzez wprowadzenie dodatkowych mutacji w genach enzymów glikolitycznych. Fakt ten potwierdzają także wyniki badań na innym modelu bakteryjnym, *Escherichia coli*. Mutacje w genach kodujących acetylotransferazę fosforanową (*ata*) oraz kinazę octanową (*ackA*), enzymy biorące udział w szlaku metabolizmu pirogronianu, znosiły fenotyp temperaturo-wrażliwości wywołany obecnością mutacji w genach *dnaA*, *dnaG* oraz *dnaN*. Ponadto, delecja genów kodujących izomerazę glukozo-fosforanową (*pgi*) oraz acetylotransferazę fosforanową (*pta*) supremowała negatywne efekty mutacji w genie *dnaB* (1).

Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że zaangażowanie enzymów CCM w regulację procesu replikacji może dotyczyć także organizmów eukariotycznych (1). Między innymi wiadomo, że część z enzymów metabolicznych [np. LDH (dehydrogenaza mleczanowa), HK (heksokinaza), PFK (fosfofruktokinaza), GAPDH (dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego), ALDO (aldolaza)] jest obecna w jądrze komórkowym. Poza tym, badania przeprowadzone na komórkach ludzkich gruczołakoraka jajnika wykazały, że delecja genu syntazy cytrynianowej (*CS*) powoduje rozregulowanie metabolizmu komórkowego i obniżenie wydajności proliferacji. Inne badania przeprowadzone również na komórkach nowotworowych pokazały, że wyciszenie ekspresji genu *SDHA* (kodującego dehydrogenazę bursztynianową) powoduje spadek tempa proliferacji. Z kolei delecja genów *FH* (kodującego fumarazę) i *SDHA/B* (kodujących dehydrogenazę bursztynianową) w komórkach HeLa doprowadziła do akumulacji fumaranu i bursztynianu, co ostatecznie spowodowało zatrzymanie cyklu komórkowego.

Dotychczasowe badania nad powiązaniem replikacji DNA z centralnym metabolizmem węgla przeprowadzone zostały na komórkach prokariotycznych oraz na komórkach nowotworowych. Te drugie charakteryzują się wieloma zmianami w funkcjonowaniu szlaków metabolicznych oraz procesie replikacji. Zatem celem moich badań było określenie wpływu wydajności ekspresji genów metabolicznych na procesy replikacji i naprawy DNA w zdrowych komórkach pochodzących z organizmu ludzkiego. To kryterium spełniały fibroblasty linii HDFa (ang. Human Dermal Fibroblasts adult). Poza prawidłowo

funkcjonującymi podstawowymi procesami, komórki te aktywnie dzielą się przez całe ludzkie życie. W moich badaniach wybrałam cykl Krebsa jako część centralnego metabolizmu węgla, którego zaburzenia mogą wpływać na regulację replikacji DNA. W dalszych etapach mojej pracy, w celu sprawdzenia efektu wyciszenia ekspresji genów metabolicznych na cykl komórkowy wybrałam geny cyklu Krebsa kodujące następujące enzymy: akonitazę 2 (gen *ACO2*), syntazę cytrynianową 1 (gen *CSI*), dehydrogenazę izocytrynianową 2 (gen *IDH2*), dehydrogenazę izocytrynianową 3 (gen *IDH3B*), dehydrogenazę α -ketoglutaranową (gen *OGDH*), tiokinazę bursztynianową 2 (gen *SUCLG2*), dehydrogenazę bursztynianową (gen *SDHA*), fumarazę (gen *FH*), dehydrogenazę jabłczanową 1 (gen *MDH1*), dehydrogenazę jabłczanową 2 (gen *MDH2*). Ekspresję genów wyciszałam pojedynczo, z zastosowaniem krótkich interferujących siRNA (ang. small interfering RNA), które łącząc się z komplementarnym fragmentem mRNA danego genu powodują wyciszenie jego ekspresji. Poziom mRNA po przeprowadzeniu transfekcji (wprowadzeniu siRNA) poddawałam analizie z wykorzystaniem odwrotnej transkrypcji i ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. RealTimePCR lub qPCR). Poziom wyciszenia wynosił 80-90% z nielicznymi wyjątkami: *IDH3B* - 40%, *OGDH* - 60%, *SDHA* - 70%. W celu zbadania cytotoksycznego wpływu siRNA i odczynnikado transfekcji użyłam testu MTT, a także analizowałam wcielanie bromodeoksyurydyny (ang. bromodeoxyuridine, BrdU) do nowo powstającego DNA oraz określałam żywotność komórek za pomocą cytometru przepływowego z oprogramowaniem „Count and viability”. Wszystkie wykonane analizy potwierdziły brak cytotoksycznego działania siRNA oraz odczynnika do transfekcji na komórki HDFa.

Kolejnym etapem mojej pracy była analiza cyklu komórkowego z wykorzystaniem cytometru przepływowego typu MUSE® z oprogramowaniem „Cell cycle”. Określałam procent komórek w poszczególnych fazach podziału mitotycznego: G1, S, G2 i M. Podczas wyciszania ekspresji genów *CSI*, *ACO2*, *SUCLG*, *SDHA*, *FH*, *MDH2* obserwowałam opóźnione o około 1-4h wejście komórek w fazę S cyklu komórkowego. Dodatkowo wyciszenie genów *CSI*, *ACO2*, *FH*, *MDH2* powodowało mniejszą efektywność procesu replikacji DNA o około 15-40% w stosunku do kontroli, którą stanowiły komórki nietraktowane siRNA (2). Dodatkowe potwierdzenie wpływu obniżenia wydajności ekspresji wyżej wymienionych genów na proces replikacji DNA stanowiły obserwowane spadki wydajności syntezy DNA podczas analiz z użyciem BrdU.

W dalszej części mojej pracy sprawdzałam efekty wyciszenia ekspresji genów związanych z replikacją i naprawą DNA na przebieg cyklu komórkowego linii HDFa.

Podczas wstępnych badań sprawdzonych zostało 8 genów kodujących enzymy zaangażowane w replikację lub naprawę DNA: *CDC6* (gen kodujący białko 6 cyklu podziałowego komórki), *DNA2* (gen kodujący helikazę/nukleazę 2 replikacji DNA), *HELQ* (gen kodujący helikazę), *LIG1* (gen kodujący ligazę 1), *LIG4* (gen kodujący ligazę 4), *TOP3B* (gen kodujący topoizomerazę 3B), *POLI* (gen kodujący polimerazę DNA iota), *PRIM2* (gen kodujący prymazę 2) (badania te wykonałam wspólnie z mgr Karoliną Fornalewicz). Po określeniu wpływu wyciszenia ekspresji genów replikacyjnych i reperacyjnych na cykl komórkowy, do dalszej pracy wybrane zostały 4 geny: *POLI*, *LIG4*, *TOP3B* oraz *PRIM*. Badania przeprowadzone zostały analogicznie do wyżej opisanych doświadczeń z genami cyklu Krebsa. Poziom wyciszenia ekspresji genów wynosił 80-90%. Z kolei analizy z wykorzystaniem testu MTT, BrdU, jak i cytometrii przepływowej wykluczyły cytotoksyczne działanie siRNA. Co ważne, wyciszenie ekspresji wybranych genów kodujących białka zaangażowane w replikację i naprawę DNA skutkowało mniej efektywnym wejściem komórek w fazę S cyklu komórkowego i obniżonym poziomem syntezy DNA w stosunku do kontroli (3).

Wyniki uzyskane z powyższych badań nad wpływem wyciszenia ekspresji pojedynczych genów metabolicznych lub replikacyjnych/reperacyjnych na tempo proliferacji komórek i efektywność wchodzenia komórek w fazę S pozwoliły mi na postawienie kolejnego pytania: czy wyciszenie ekspresji genów kodujących enzymy cyklu Krebsa ma wpływ na efekty powstające w wyniku wyciszenia ekspresji genów replikacyjnych i reperacyjnych? W celu sprawdzenia efektów wyciszenia ekspresji genów cyklu Krebsa na cykl komórkowy komórek z obniżonym poziomem ekspresji genów zaangażowanych w replikację i naprawę DNA przeprowadziłam podwójną transfekcję komórek z wykorzystaniem dwóch różnych siRNA (wyciszającego ekspresję wybranego genu cyklu Krebsa i wybranego genu replikacyjnego lub reperacyjnego). Poziom wyciszenia zbadałam z zastosowaniem reakcji PCR w czasie rzeczywistym po odwrotnej transkrypcji. Uzyskane wyniki jednoznacznie potwierdziły, iż wyciszenie było równie skuteczne, jak w przypadku wyciszenia ekspresji pojedynczego genu. Badanie cytotoksyczności potwierdziło także brak negatywnego wpływu podwójnej ilości siRNA na komórki HDFa. Analizę cyklu komórkowego przeprowadziłam analogicznie do poprzednich badań z wykorzystaniem cytometru przepływowego. Wyciszenie ekspresji genu *POLI*, kodującego polimerazę DNA iota spowodowało znaczne obniżenie liczby komórek w fazie S w stosunku do komórek nietraktowanych siRNA. Dodatkowe wyciszenie genu kodującego jeden z enzymów cyklu

Krebsa (za wyjątkiem *ACO2*) powodowało supresję negatywnych skutków wyciszenia wyżej wspomnianego genu replikacyjnego, a nawet, jak w przypadku *IDH3*, wzrost liczby komórek w fazie S powyżej tej określonej dla komórek nietraktowanych siRNA. Podobne efekty obserwowałam również podczas podwójnego wyciszenia genu *LIG4* oraz genów: *IDH2*, *IDH3B*, *OGDH*, *SUCLG*, *MDH1* i *MDH2*, a także *PRIM* i *IDH2*. Wyciszenie ekspresji *IDH2* supremowało również negatywne efekty wywołane obniżeniem wydajności ekspresji genu *TOP3B*. Poza tym istniała cała grupa kombinacji, w przypadku których nie obserwowałam istotnego wpływu wyciszenia ekspresji genów kodujących enzymy cyklu Krebsa na zmianę negatywnych efektów obniżenia wydajności ekspresji genów związanych z replikacją i naprawą DNA, a nawet obserwowałam ich nasilenie (3). O zaangażowaniu niektórych enzymów cyklu Krebsa w replikację DNA świadczą także wyniki badań nad syntezą DNA z wykorzystaniem BrdU. Co bardzo ważne, we wszystkich analizowanych przeze mnie przypadkach, dodatkowe wyciszenie jednego z genów metabolicznych istotnie zwiększało poziom nowo powstającego DNA w porównaniu do komórek traktowanych siRNA przeciw genom replikacyjnym (3).

Podsumowując, wyniki przedstawione w mojej pracy wskazują, że zaburzenia cyklu komórkowego wywołane wyciszeniem ekspresji genów zaangażowanych w replikację/naprawę DNA mogą być częściowo, a nawet całkowicie, znoszone przez wyciszenie ekspresji genów kodujących poszczególne enzymy zaangażowane w cykl Krebsa. Biorąc pod uwagę specyfikę obserwowanych supresji, wyżej opisane wyniki można interpretować jako kolejny dowód genetyczny na ścisły związek pomiędzy replikacją/naprawą DNA a CCM w komórkach ludzkich. Jednakże na obecnym etapie badań oraz w świetle dostępnej wiedzy literaturowej mogę tylko przypuszczać, iż być może ze względu na obecność niektórych z enzymów metabolicznych w jądrze komórkowym rola części z nich jest bezpośrednio związana z procesem replikacji, jak np. kinazy pirogronianowej odpowiedzialnej za bezpośrednią fosforylację histonu H3. Z drugiej strony, obserwowane zmiany mogą być spowodowane nie zrównoważonym poziomem metabolitów i wynikającymi z tego powodu zaburzeniami w prawidłowym funkcjonowaniu procesów metabolicznych. Niemniej jednak, niezależnie od molekularnego mechanizmu odpowiedzialnego za obserwowane przeze mnie efekty, na podstawie powyższych danych można wnioskować, że połączenie replikacji/naprawy DNA oraz centralnego metabolizmu węgla jest powszechnym zjawiskiem biologicznym, obecnym nawet w tak odległych ewolucyjnie organizmach, jak bakterie i ludzie.

Literatura:

1. Konieczna A, **Szczepańska A**, Sawiuk K, Łyżeń R, Węgrzyn G. Enzymes of the central carbon metabolism: are they linkers between transcription, DNA replication, and carcinogenesis? *MedHypotheses*. 2015a;84:58-67.
2. Konieczna A, **Szczepańska A**, Sawiuk K, Węgrzyn G, Łyżeń R. Effects of partial silencing of genes coding for enzymes involved in glycolysis and tricarboxylic acid cycle on the entrance of human fibroblasts to the S phase. *BMC Cell Biol*. 2015b;16:16.
3. **Wieczorek A**, Fornalewicz K, Mocarski Ł, Łyżeń R, Węgrzyn G. Double silencing of relevant genes suggests the existence of the direct link between DNA replication/repair and central carbon metabolism in human fibroblasts. *Gene*. 2018; DOI: 10.1016/j.gene.2018.01.068