

Związek szlaku pentozofosforanowego z regulacją replikacji DNA w ludzkich fibroblastach

Karolina Fornalewicz

Replikacja DNA jest jednym z najważniejszych procesów zachodzących we wszystkich żywych organizmach zarówno prokariotycznych, jak i eukariotycznych.

W przeciwieństwie do organizmów prokariotycznych, u Eukariota replikacja zachodzi w jądrze komórkowym, dodatkowo synteza DNA przebiega znacznie wolniej. Jednakże rekompensowane jest to poprzez możliwość rozpoczęcia tego procesu w wielu miejscach jednocześnie. Rejony, w których rozpoczyna się replikacja określane są mianem origin replikacji. U większości zwierząt (z wyjątkiem ssaków) w stadium embrionalnym podczas syntezy DNA aktywne są praktycznie wszystkie miejsca inicjacji replikacji. Ma to na celu zapewnienie bardzo szybkiego powielenia materiału genetycznego. Dokładne kopiowanie materiału genetycznego jest niezmiernie istotne dla prawidłowego funkcjonowania komórki, jak i zachowania ciągłości danego gatunku. Replikacja jest procesem wieloetapowym, co może być czynnikiem powodującym wystąpienie błędu na którymś z etapów. Jednakże organizmy wykształciły wiele mechanizmów, które ściśle kontrolują jej przebieg. Mimo różnic w szczegółach tego procesu, ogólny schemat jego przebiegu wykazuje wiele podobieństw, a co za tym idzie, podstawy regulacji mechanizmów działania replikacji są podobne. Zaburzenia w prawidłowym przebiegu tego procesu mogą doprowadzić do rozwoju szeregu chorób, w tym nowotworów.

W związku z tym, że replikacja jest procesem endoenergetycznym, jej prawidłowe funkcjonowanie zależne jest między innymi od przebiegu centralnego metabolizmu węgla. Centralny metabolizm węgla (CCM, ang. *Central Carbon Metabolism*) to szereg przemian substratów i produktów pośrednich, dzięki którym komórka zostaje zaopatrzona w energię niezbędną do prawidłowego rozwoju i podziału. Głównym źródłem energii potrzebnej do prawidłowego funkcjonowania komórki jest glukoza. Do najważniejszych szlaków składających się na CCM należą: glikoliza, cykl Krebsa, glukoneogeneza, oraz szlak pentozofosforanowy. Nieprawidłowości w działaniu któregośkolwiek ze szlaków CCM mogą powodować problemy w funkcjonowaniu komórki, w tym również problemy w przebiegu procesu replikacji. Dotychczasowe, nieliczne badania nad rolą enzymów różnych szlaków metabolicznych sugerują, że niektóre z nich mogą uczestniczyć w regulacji procesu replikacji oraz wpływać na jej wydajność w organizmach bakteryjnych oraz drożdżach.

Jednym ze szlaków metabolicznych zaliczanych do centralnego metabolizmu węgla jest

szlak pentozofosforanowy (PPP). Szlak ten obejmuje szereg reakcji prowadzących do utleniania heksoz do pentoz. Składa się z dwóch faz: fazy oksydacyjnej – złożonej z trzech nieodwracalnych reakcji oraz fazy nieoksydacyjnej – tworzonej przez szereg odwracalnych przemian katalizowanych przez enzymy allosteryczne. W fazie oksydacyjnej dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (G6PD) przekształca glukozy-6-fosforan do NADPH i 6-fosfoglukonolaktonu, który jest następnie hydrolizowany przez fosfoglukonolaktonazę (PGLS) do 6-fosfoglukonianu (6PG). Pierwsze dwa etapy mogą być również katalizowane przez dehydrogenazę heksozy-6-fosforanową (H6PD). Następnie 6-fosfoglukonian za pośrednictwem 6-fosfoglukonodehydrogenazy (PGD) przekształcany jest w NADPH i rybulozy-5-fosforan (Ru5P), który przechodzi do fazy nieoksydacyjnej. Początkowo izomeraza rybulozy-5-fosforanowa (RPI) i epimeraza rybulozy-5-fosforanowa (RPE) przekształca rybulozy-5-fosforan w rybozy-5-fosforan (R5P) i ksylulozy-5-fosforan (Xu5P). Następnie, w zależności od zapotrzebowania komórki, R5P może zostać przekształcony np. w prekursor nukleotydów. Wówczas działają takie enzymy jak pirofosfokinaza rybulozy-5-fosforanu (PRPS), rybokinaza (RBKS) i fosfoglukomutaza (PGM), które przekształcają je odpowiednio do pirofosforanu pirofosforylu (PRPP), D-rybozy (D-Rib) i D-rybozy-1-fosforanu (D-Rib-1P). Dodatkowo R5P wraz z Xu5P może zostać przekształcony przez transketolazę (TKT) do 3-fosforanu aldehydu glicerynowego (G3P) i sedoheptulozy-7-fosforanu (S7P). Następnie transaldolaza (TALDO) przekształca S7P i G3P do fruktozy-6-fosforanu (F6P) i erytrozy-4-fosforanu (E4P). G3P z aldehydem octowym może zostać przekształcony przez aldolazę dezoksyrybozy-fosforanową (DERA) do 2-deoksy-D-rybozy-5-fosforanu (2d-D-Rib-5P). Ostatecznie, dzięki RBKS i PGM, 2d-D-Rib-5P może zostać przekształcony w 2-deoksy-D-rybozę (2d-D-Rib) i 2-deoksy-D-rybozy-1-fosforan (2d-DRib-1P). Jeżeli komórka jest aktywna i wzrasta jej zapotrzebowanie na NADPH, większe stężenie NADP⁺ przyspiesza tempo przebiegu cyklu.

Zaobserwowano, że w komórkach prokariotycznych replikacja DNA zależy od dostępności substancji odżywczych. Sztuczne wywołanie głodu powodowało hamowanie inicjacji replikacji w komórkach *Escherichia coli* oraz elongacji replikacji DNA

w specyficznych miejscach chromosomu u *Bacillus subtilis*. Wpływ na tempo replikacji ma nie tylko niedobór nukleotydów i energii. Jak pokazują badania przeprowadzone na modelu bakteryjnym, wydajność procesu replikacji zmienia się w zależności od obecności lub braku określonych enzymów wchodzących w skład poszczególnych szlaków metabolicznych. W badaniach tych jednoznacznie wykazano, że efekt mutacji w genach replikacyjnych powodujących spadek tempa replikacji może zostać zniesiony poprzez wprowadzenie dodatkowych delecji określonych genów kodujących enzymy metaboliczne. Podobne zależności pojawiają się również u innych organizmów, w tym drożdży. W niniejszej pracy przedstawiam wyniki moich badań

rozszerzających dotychczasową wiedzę o dane na temat tego zjawiska w komórkach ludzkich.

Pierwszym celem mojej pracy była teoretyczna analiza możliwości powiązania szlaku pentozofosforanowego z regulacją replikacji DNA (Konieczna i wsp. 2015). Kolejnym postawionym przeze mnie zadaniem było sprawdzenie, czy wyciszenie ekspresji poszczególnych genów metabolicznych szlaku pentozofosforanowego wpłynie w istotny sposób na przebieg procesu replikacji w komórkach eukariotycznych. Wszystkie zaplanowane eksperymenty w ramach mojej pracy doktorskiej wykonałam na ludzkich fibroblastach pochodzących od zdrowej osoby (HDFa, ang. *Human Dermal Fibroblasts, adult*). Jest to o tyle istotne, że większość dotychczasowych badań przeprowadzano na komórkach bakteryjnych lub nowotworowych. Jak wiadomo, w tych drugich z wymienionych komórek procesy metabolizmu i replikacji są często bardzo mocno zaburzone, a co za tym idzie, trudno jednoznacznie wskazać, czy obserwowane powiązania rzeczywiście występują w zdrowej komórce. W kolejnym etapie pracy zbadalam wpływ podwójnego wyciszenia ekspresji genów – zarówno metabolicznych, jak i replikacyjnych na przebieg replikacji i podziałów komórkowych.

Wszystkie zaplanowane eksperymenty rozpoczynałam od wyciszenia ekspresji wybranych uprzednio genów w badanych komórkach. Wykonywałam to za pomocą komercyjnie dostępnych siRNA. Są to dwuniciowe fragmenty RNA, które po wprowadzeniu do komórki eukariotycznej, dzięki obecności w cytoplazmie odpowiedniej RNazy, podlegają pocięciu do krótkich jednoniciowych odcinków RNA, czyli rzeczywistych siRNA. W tej formie transportowane są do jądra, gdzie wiążąc się do homologicznych rejonów w nowo powstałym mRNA prowadzą do jego degradacji. Do analizy cyklu komórkowego niezbędna była synchronizacja komórek poddawanych badaniom. Ponieważ w dalszej części pracy miałam analizować cykl komórkowy, synchronizacja musiała odbywać się bez stosowania substancji chemicznych, które mogłyby spowodować zmiany w cyklu komórkowym. Ostatecznie do synchronizacji zastosowałam zmniejszające się stężenie surowicy bydlęcej w pożywce. W efekcie komórki zatrzymywały się w fazie G0/G1 cyklu komórkowego. Następnie oznaczałam poziom mRNA w badanych komórkach. Przeprowadzałam izolację RNA i reakcję odwrotnej transkrypcji przy użyciu komercyjnie dostępnych zestawów. Poziom wyciszenia ekspresji badanych genów sprawdzałam z wykorzystaniem reakcji PCR w czasie rzeczywistym po odwrotnej transkrypcji. Dzięki temu porównywałam poziom ekspresji genów poddanych wyciszeniu w stosunku do genów referencyjnych i w odniesieniu do genów niewyciszonych. Poziom wyciszenia ekspresji wynosił 70-85% z wyjątkiem genów *G6PD* i *RBKS*, których poziom wyciszenia wyniósł 45-55% (Fornalewicz i wsp., 2017). Następnie przeprowadzałam analizę cyklu komórkowego z wykorzystaniem cytometru przepływowego Muse Cell Analyzer. Określałam procent komórek,

które znajdowały się w poszczególnych etapach cyklu komórkowego oraz czas, w jakim wchodziły w te etapy. Sprawdzenie wpływu stosowanych metod na stan komórek określałam badając ich liczbę i żywotność przy pomocy Muse Count and Viability Assay Kit. Tempo proliferacji komórek określałam kolorymetrycznie za pomocą testu BrdU, Cell Proliferation ELISA, który pozwala na ilościowe oznaczenie poziomu syntezy DNA. Ostatecznie w celu sprawdzenia wydajności procesu replikacji po wyciszeniu genów metabolicznych i replikacyjnych wykrywałam i oznaczałam ilościowo zawartość białek za pomocą analizy Western-blotting (Fornalewicz i wsp., 2017). Analizując wyniki wykonanych przeze mnie doświadczeń mogę stwierdzić, że podejmowane działania nie wpływały w negatywny sposób na liczbę komórek oraz ich żywotność.

W przypadku pojedynczego wyciszenia ekspresji genów zauważyłam, że znaczne obniżenie ekspresji genów *H6PD*, *PRPS1* oraz *RPE* powodowało zmniejszenie liczby komórek wchodzących w fazę S cyklu komórkowego oraz obniżało poziom syntezy DNA. Natomiast wyciszenie ekspresji genów *G6PD*, *RBKS* oraz *TALDO* powodowało wzrost liczby komórek wchodzących w fazę S cyklu komórkowego, przy jednoczesnym znacznym wzroście poziomu syntezy DNA, z wyjątkiem wyciszenia ekspresji genu *RBKS* (brak wpływu). Zaburzenia w ekspresji genu *DERA* spowodowały opóźnienie w wejściu komórek w fazę S cyklu komórkowego, nie zmieniając liczby komórek we wspomnianej fazie. Wyciszenie ekspresji genów *PGLS*, *RPIA* oraz *TKT* nie powodowało zmian w przebiegu cyklu komórkowego (Fornalewicz i wsp., 2017).

W kolejnym etapie prowadzonych badań, zbadałam efekty wyciszenia genów replikacyjnych dla prymazy 2 (gen *PRIM2*), polimerazy DNA iota (gen *POLI*), ligazy 4 (gen *LIG4*) oraz topoizomerazy III β (gen *TOP3B*). Znaczne wyciszenie ekspresji analizowanych genów replikacyjnych – około 65-80% powodowało opóźnienie wejścia komórek w fazę S lub w znacznym stopniu zmniejszało liczbę komórek wchodzących w tę fazę (wyniki uzyskane wspólnie z mgr Anetą Wieczorek).

W oparciu o dotychczasowe wyniki moich badań oraz dostępne dane literaturowe, sugerujące istnienie bezpośrednich powiązań pomiędzy enzymami szlaków metabolicznych a replikacją i naprawą DNA, postanowiłam sprawdzić czy obniżenie poziomu ekspresji konkretnych genów kodujących enzymy szlaku PPP będzie w stanie przynajmniej częściowo złagodzić negatywne efekty wyciszenia ekspresji wyżej wymienionych genów dla białek replikacyjnych lub naprawczych. W tym celu przeprowadziłam analogiczne badania, jak opisane powyżej. W przypadku podwójnego wyciszenia ekspresji genów metabolicznych (szlak PPP) oraz replikacyjnych/naprawczych: *POLI*, *PRIM2*, *TOP3B*, *LIG4* otrzymałam następujące wyniki: obniżenie ekspresji *TOP3B* zostaje w pewnym stopniu zniwelowane przez wyciszenie ekspresji pojedynczych genów metabolicznych, takich jak *RBKS*, *TKT* oraz *TALDO*. Co ciekawe, wyciszenie

ekspresji genu *RBKS* jako jedyne również supremowało negatywne efekty związane z wyciszeniem genu *PRIM*. Z kolei negatywne efekty wyciszenia ekspresji genów *POLI* oraz *LIG* zostały częściowo zniesione poprzez dodatkowe zmniejszenie poziomu ekspresji genów takich jak *H6PD*, *RPIA*, *RBKS* oraz *TALDO*. Dodatkowo skutki upośledzenia ekspresji genu *POLI* zostały po części zniwelowane dzięki obniżeniu poziomu ekspresji *G6PD*, *PGLS*, *RPE* oraz *TKT* (Wieczorek i wsp., 2018).

Podsumowując, w oparciu o uzyskane przeze mnie wyniki badań oraz dotychczas opublikowane dane literaturowe, można wnioskować o ścisłym zaangażowaniu poszczególnych enzymów metabolicznych, a w tym przypadku wchodzących w skład szlaku PPP, w regulację cyklu komórkowego oraz procesów replikacji i naprawy DNA. Za prawidłowością takiego toku myślenia przemawia choćby fakt, iż obniżenie ekspresji określonych genów metabolicznych supremowało negatywne skutki obniżenia ekspresji poszczególnych genów dla białek replikacyjnych/naprawczych, a także istotnie wpływało na proces syntezy DNA w tych komórkach. Jednakże na podstawie przedstawionych powyżej danych niemożliwe jest określenie dokładnych mechanizmów obserwowanych efektów. Można tylko przypuszczać, że ze względu na obecność niektórych enzymów w jądrze komórkowym mogą one być nawet bezpośrednio zaangażowane w regulację procesu replikacji lub naprawy DNA poprzez oddziaływania białko-białko. Równie prawdopodobne wydaje się także, że wpływają one na tempo podziałów komórkowych poprzez zaburzenie proporcji dostępnych nukleotydów (część z enzymów uczestniczy w syntezie ich prekursorów) czy bilansu energetycznego w komórce. Dlatego też, aby móc jednoznacznie odpowiedzieć na te pytania, konieczne będą dalsze analizy.