

**Regulacja ekspresji genu SLC2A5 i białka GLUT5 przez wybrane  
biologicznie aktywne związki pochodzenia naturalnego**

mgr inż. Katarzyna Chałaśkiewicz

Promotor:

Prof. dr hab. Maria Koziółkiewicz

Drugi promotor:

Dr. hab. Marcin Ratajewski profesor nadzwyczajny IBM PAN

## Streszczenie

Fruktoza w diecie mieszkańców krajów rozwiniętych często przekracza rekomendowany 10% udział w dziennym bilansie energetycznym. Jest to alarmujące zjawisko, ponieważ fruktoza jest postrzegana jako przyczyna wielu chorób metabolicznych. W najnowszych badaniach udowodniono także jej związek z większą zapadalnością na choroby nowotworowe. Za dokomórkowy transport fruktozy w jelicie, odpowiedzialne jest białko GLUT5, kodowane przez gen *SLC2A5*. GLUT5 jest obecny w błonie komórkowej enterocytów po stronie apikalnej. Szlaki sygnałowe oraz czynniki transkrypcyjne regulujące ekspresję tego genu mimo wzrastającej liczby publikacji na ten temat, nie zostały w dobrym stopniu poznane. W danych literaturowych pojawiły się także wzmianki na temat wpływu związków naturalnych jak galusanu (-)-epikatechiny z zielonej herbaty, rubusozydu z jeżyny bezkolcowej (*Rubus suavissimus*) oraz glukozydu astragaliny z owoców szkarłatki amerykańskiej (*Phytolacca americana*) o aktywności inhibitorów transportera GLUT5, jednak wskazuje się na ich niską aktywność i specyficzność. Ze względu na rolę fruktozy w rozwoju niektórych nowotworów, białko GLUT5 wskazywane jest jako istotny cel terapeutyczny w terapii przeciwnowotworowej.

W niniejszej pracy doktorskiej modelem komórkowym była linia komórek epitalialnych raka jelita grubego Caco-2, w której wysoki poziom ekspresji mRNA *SLC2A5* jak również białka GLUT5 potwierdzono odpowiednio metodami RT-PCR w czasie rzeczywistym oraz Western blotting.

Jednym z zadań niniejszej pracy była identyfikacja czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za regulację ekspresji genu *SLC2A5*. W tym celu sklonowano sekwencję 5'-flankującą gen *SLC2A5* człowieka i poddano ją analizie *in silico* oraz określono jej aktywność w teście genów reporterowych. Uzyskane wyniki sugerują, że we fragmencie -214/+58 znajduje się promotor podstawowy a w regionie -1050/-650 sekwencja wzmacniająca. Po serii eksperymentów z użyciem wektorów ekspresyjnych dla czynników transkrypcyjnych wytypowanych w trakcie analizy bioinformatycznej, stwierdzono, że czynniki USF-1 i USF-2 indukują aktywność genu reporterowego zawierającego promotor genu *SLC2A5*. Po przeprowadzeniu analizy delecyjnej, wskazano miejsce odpowiedzi dla czynników rodziny USF w regionie -214/+58, gdzie zidentyfikowano sekwencję E-BOX. Jednakże, po użyciu siRNA zdolnych do wyciszenia RNA kodujących te czynniki, nie stwierdzono zmian w ekspresji genu *SLC2A5*, co wskazało na brak ich bezpośredniego wpływu na transkrypcję tego genu. Ze

wzglądu na to, że sekwencję E-BOX rozpoznają także inne czynniki m.in. z rodziny SNAI wykonano kolejne badania z użyciem czynników SNAI1 i SNAI2. Nadekspresja SNAI1 i SNAI2 powodowała zahamowanie aktywności promotora genu *SLC2A5* a także jego mRNA oraz białka GLUT5. Mutageneza sekwencji E-BOX znosiła ten efekt. Wykonano również analizę testu ruchliwości elektroforetycznej kompleksu białko-DNA (EMSA), potwierdzającą bezpośrednie wiązanie się czynników SNAI1 i SNAI2 do sekwencji regulatorowej promotora genu *SLC2A5*.

Po identyfikacji czynników SNAI1 i SNAI2 jako regulatorów ekspresji genu *SLC2A5*, postanowiono poszukać związków farmakologicznie czynnych, które zwiększą ekspresję obu tych czynników, w celu zahamowania ekspresji genu *SLC2A5*. Analiza literatury naukowej wskazała, że takim związkiem może być trichostatyna A, będąca inhibitorem deacetylazy histonów. Eksperymenty przeprowadzone z użyciem trichostatyny A potwierdziły jej hamujące działanie względem promotora genu *SLC2A5* w teście genów reporterowych. Analiza ekspresji genów metodą RT-PCR w czasie rzeczywistym pozwoliła stwierdzić, że trichostatyna A indukuje ekspresję mRNA dla genów *SNAI1* i *SNAI2* oraz hamuje ekspresję genu *SLC2A5*. Podobne wyniki uzyskano na poziomie białka przy zastosowaniu techniki Western blot. Test EMSA pokazał również zwiększenie wiązania białek lizatów jądrowych do fragmentu zawierającego E-BOX. Wykonano również immunoprecypitację chromatyny, która pokazała zwiększoną zdolność wiązania się czynnika SNAI1 do promotora po działaniu trichostatyny A.

W najnowszych publikacjach podkreślono fakt powiązania zwiększonej ekspresji *SLC2A5* z większą opornością na chemioterapeutyki. W niniejszej pracy sprawdzono również czy trichostatyna A ma zdolność uwrażliwiania komórek nowotworowych o wysokiej ekspresji tego genu. Okazało się, że preinkubacja komórek z trichostatyną A wyraźnie zwiększa wrażliwość komórek Caco-2 na związki platyny (cisplatinę i oksaliplatinę), jednocześnie udowodniono specyficzność tego efektu wobec nowotworów o wysokiej ekspresji *SLC2A5*.

Jednym z założeń pracy doktorskiej, było także znalezienie biologicznie aktywnych fitozwiązków wykazujących hamujący wpływ na ekspresję genu *SLC2A5*. Przetestowano cztery związki: apigeninę, kwercetynę, kwas ursolowy oraz chryzynę. Po analizie RT-PCR w czasie rzeczywistym, stwierdzono, że jedynie apigenina hamuje poziom mRNA dla genu *SLC2A5*. Po identyfikacji apigeniny jako inhibitora ekspresji *SLC2A5*, postanowiono sprawdzić jej wpływ na

ekspresję zidentyfikowanych czynników transkrypcyjnych rodziny SNAI. Okazało się, że apigenina również hamuje ekspresję *SNAI1* na poziomie mRNA i białka. Uzyskany wynik wskazuje na odmienną mechanizm działania apigeniny i trichostatyny A. W literaturze wspomniano o aktywności apigeniny jako inhibitora deacetylaz histonów, jednak wynik analizy Western blot pokazały brak wpływu apigeniny na status acetylacji histonu H3.

Ze względu na wysoką zawartość apigeniny w rumianku, wykonano ekstrakt z kwiatów rumianku pospolitego *Matricaria chamomilla* L. Co ciekawe, wyniki z wykorzystaniem tych ekstraktów pokazały, że hamują one ekspresję *SLC2A5*. Część ekstraktów poddano procesowi fermentacji mlekowej z użyciem bakterii mlekowych (*Levilactobacillus brevis* ATCC 14869). Fermentacja spowodowała zwiększenie hamujących właściwości preparatu wobec mRNA dla genu *SLC2A5* oraz ukazała właściwości indukujące wobec *SNAI1*. Analiza UPLC wykazała brak apigeniny w ekstrakcie po fermentacji, co sugeruje, że związki inne niż apigenina obecne w preparacie są odpowiedzialne za indukcję czynnika SNAI1 i zahamowanie ekspresji *SLC2A5*.

Wyniki uzyskane w trakcie realizacji niniejszej pracy doktorskiej wskazują, że zastosowanie inhibitorów deacetylaz histonów ma potencjał terapeutyczny wobec komórek raka jelita o wysokiej ekspresji genu *SLC2A5* i może zwiększać efektywność działania cisplatyny oraz oksaliplatyny. Być może podobne działanie mogą mieć niektóre fitozwiązki w tym te, obecne w rumianku pospolitym.