

Anna LALIK  
Politechnika Śląska

## **ROLA MIR-19 W REGULACJI EKSPRESJI FUKOZYLOTRANSFERAZY 8 W KOMÓRKACH CZERNIAKA ME45**

**Streszczenie.** Poziom ekspresji fukozylotransferazy 8 (FUT8) koreluje z rozwojem i agresywnością oraz opornością na leczenie wielu typów nowotworów. Poznanie więc mechanizmów regulujących poziom ekspresji FUT8 wydaje się niezwykle istotne. W ramach niniejszej pracy przedstawiono wstępne wyniki wskazujące, że miR-19a jest jednym z czynników wpływających na poziom ekspresji FUT8 w komórkach czerniaka Me45.

## **ROLE OF MIR-19 IN THE REGULATION OF FUCOSYLTRANSFERASE 8 EXPRESSION IN ME45 MELANOMA CELLS**

**Summary.** The expression level of fucosyltransferase 8 (FUT8) correlates with the development and aggressiveness and resistance to treatment of many types of cancer. Thus, learning more about the mechanisms that regulate FUT8 expression levels appears to be of paramount importance. The present study presents preliminary results indicating that miR-19a is one of the factors influencing the expression level of FUT8 in Me45 melanoma cells.

### **1. Wstęp**

Cechą charakterystyczną komórek nowotworowych jest przeprogramowanie metaboliczne, które umożliwia im adaptację do zmieniających się warunków wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych. Zmiany zachodzące w komórce obejmują zarówno zaburzenia w przekazywaniu sygnału jak i zmiany w aktywności oraz specyficzności czynników transkrypcyjnych. Wśród zmian zachodzących w komórkach nowotworowych istotną rolę odgrywają miRNA oraz glikany (struktury cukrowe), gdyż są one powiązane nie tylko z rozwojem i inwazyjnością nowotworów ale także odpowiadają za oporność nowotworów na radio- i chemoterapię. Zatem oba te rodzaje cząsteczek (miRNA i glikany) są często wykorzystywane jako biomarkery procesów nowotworzenia oraz markery skuteczności zastosowanej terapii.

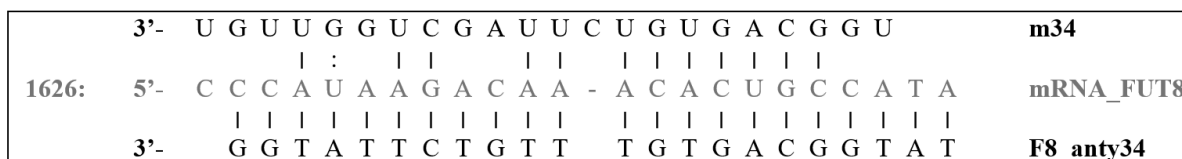
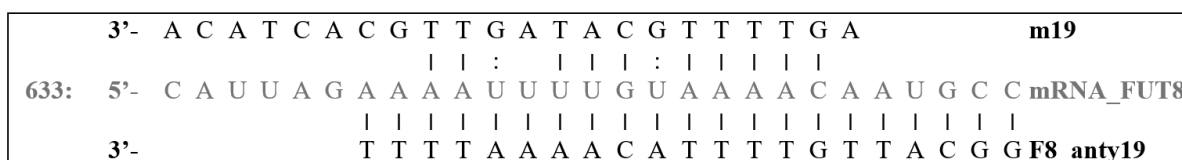
Glikany są istotnym elementem modyfikującym białka i lipidy w komórce, wpływającym na strukturę, stabilność i aktywność tych makrocząsteczek [8]. Na poziomie komórkowym glikany uczestniczą we wszystkich istotnych procesach komórkowych, w tym proliferacji, adhezji i komunikacji wewnątrz- i międzykomórkowej [16]. Proces glikozylacji jest wrażliwy na zmiany zachodzące

w komórce a występowanie charakterystycznych struktur glikanów można powiązać z powstawaniem i rozwojem stanów patologicznych, w tym z rozwojem nowotworów. Zmiany w profilu glikozylacji charakterystyczne dla komórek nowotworowych, w porównaniu do komórek prawidłowych, obejmują wzrost ilości rozgałęzionych, wysokomannozowych i złożonych N-glikanów, zawierających reszty kwasu sialowego oraz fukozylowany rdzeń [12]. W komórkach nowotworowych obserwowane jest również skrócenie łańcuchów O-glikanów z równoczesnym wzrostem liczby łańcuchów O-glikanów zawierających fukozę i/lub kwas sialowy [16]. O-glikozylacja jest procesem o tyle istotnym, że wykazano, że O-GlcNAcylation odgrywa znaczącą rolę w wyborze ścieżki naprawy dwuniciowych pęknięć DNA i promuje proliferację komórek nowotworowych [22]. Z rozwojem i przerzutowaniem raka powiązано również proces fukozytacji [11]. Jednym z kluczowych enzymów związanych z fukozytacją jest fukozylotransferaza 8 (FUT8), która jest jedynym ssaczym enzymem katalizującym przyłączenie reszty fukozylowej do rdzenia N-glikanów wiązaniem  $\alpha$ 1-6 glikozydowym [6]. Poziom ekspresji FUT8 powiązany jest ściśle ze stopniem fukozytacji glikanów przyłączonych do białek kluczowych dla immunosupresji, adhezji, migracji czy przerzutowania komórek nowotworowych [20]. Przyłączenie fukozy wpływa na stabilność i aktywność tych białek. Wykazano również związek między FUT8 a leko- i radioopornością komórek nowotworowych [19]. W komórkach czerniaka obniżenie poziomu ekspresji FUT8 skutkuje zahamowaniem inwazji i rozprzestrzeniania się guza [1]. Co więcej stwierdzono, że wyciszenie ekspresji FUT8 w komórkach nowotworowych powoduje nie tylko obniżenie poziomu fukozytacji rdzenia N-glikanów ale wpływa również na poziom ekspresji białek związanych z glikozylacją, metabolizmem glukozy, naprawą DNA czy białek uczestniczących w procesie translacji oraz białek regulujących fałdowanie i stabilizację innych białek [13]. Znaczenie FUT8 w mechanizmie transformacji komórek zdrowych w nowotworowe oraz wpływ poziomu FUT8 na szereg istotnych procesów komórkowych sprawia, że FUT8 jest obiecującym celem terapeutycznym. Dogłębne poznanie mechanizmów regulacji ekspresji FUT8 będzie mogło przyczynić się do precyzyjnego opracowania strategii terapeutycznej skierowanej w stronę FUT8.

Biosynteza glikanów jest procesem wieloetapowym katalizowanym przez enzymy przyłączające jednostki cukrowe (glikozylotransferazy) i enzymy odcinające jednostki cukrowe (glikozydazy), co sprawia, że rozwój glikobiologii jest nieodłącznie powiązany z rozwojem narzędzi bioinformatycznych. Profil glikozylacji komórek zależy od poziomu ekspresji glikozylotransferaz i glikozydaz, lokalizacji tych enzymów w komórce, aktywności białek opiekuńczych, metabolizmu i dostępności substratów [16]. Złożoność szlaku glikozylacji powoduje, że mechanizmy kontroli syntezy glikanów, a także mechanizmy regulacji ekspresji enzymów związanych z glikozylacją, są stosunkowo słabo poznane. Wiadomo jednak, że poziom ekspresji glikozylotransferaz jest regulowany, między innymi, przez miRNA. MiRNA są krótkimi, niekodującymi cząsteczkami RNA, które wiążąc się z cząsteczkami mRNA blokują jego translację lub inicjują degradację mRNA. W komórkach nowotworowych mechanizmy kontrolujące ekspresję miRNA są rozregulowane, przez co poziom ekspresji poszczególnych miRNA można powiązać ze stopniem rozwoju nowotworu [17]. W ramach niniejszej pracy zbadano, czy z jedno z miRNA będących markerami progresji nowotworów (miR-19a) może regulować ekspresję FUT8.

## 2. Metodyka

W celu zbadania roli miR-19a w regulacji ekspresji FUT8 posłużono się techniką „miR-masking”. Technika ta polega na wprowadzeniu do komórki oligonukleotydów o sekwencji komplementarnej do miejsca wiązania się miR w badanym mRNA. Przyłączenie się miR-maski do mRNA uniemożliwia przyłączenie się miRNA do mRNA co zapobiega inhibicji translacji/degradacji mRNA [3]. W badaniach wykorzystano cztery oligonukleotydy (Rys.1): dwa oligonukleotydy o sekwencji dojrzałego miRNA (m19 odpowiada sekwencji miRNA-19a; m34- miRNA-34) i dwa oligonukleotydy o sekwencji w pełni komplementarnej do miejsca wiązania miRNA w sekwencji mRNA\_FUT8. Oddziaływanie miR-34 [1] z mRNA\_FUT8 jest dobrze udokumentowane w literaturze [5]), więc zostało wykorzystane jako kontrolne miRNA, mające wykazać zachowanie transkryptu po wprowadzeniu do komórek miR-masek blokujących miejsce wiązania miRNA oddziałującego z mRNA\_FTU8.



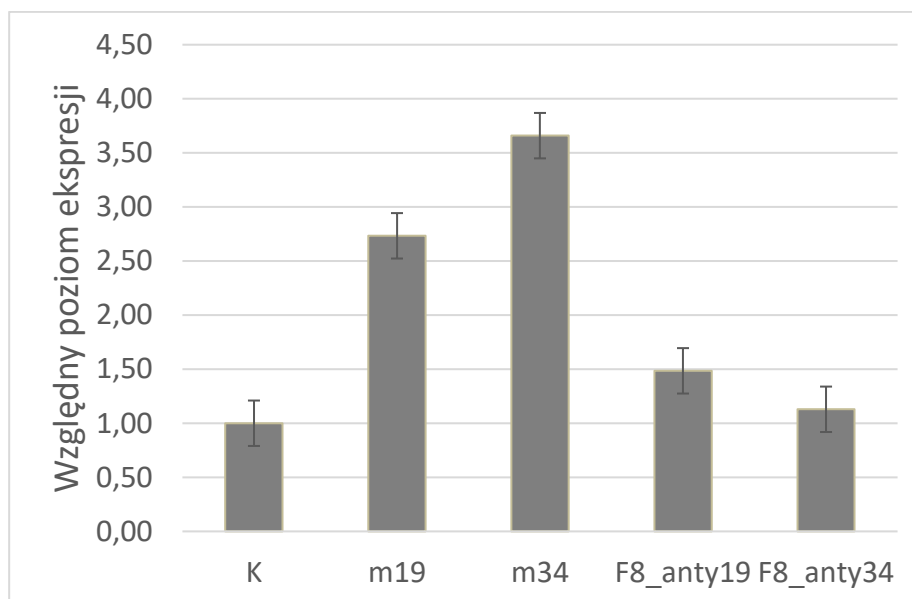
Rys.1. Sekwencje miR-mask wykorzystywanych w badaniach. Na szaro zaznaczono sekwencję mRNA kodującą FUT8 (mRNA\_FUT8). Liczba po lewej wskazuje pozycję miejsca wiązania miRNA w sekwencji mRNA\_FUT8. m19, F8\_anty19, m34, F8\_anty34- sekwencje miR-masek. Linie poziome łączą komplementarne nukleotydy w sekwencji miR-maski i sekwencji mRNA\_FUT8.

Badania prowadzono na ludzkiej linii komórkowej złośliwego czerniaka Me45. Komórki Me45 transfekowano 3pmol miR-maskami i po 24h oznaczano działanie masek na poziomie transkrypcyjnym (za pomocą RT-qPCR wykorzystując zestaw odczynników oparty na SYBR Green) i na poziomie aktywności białka oznaczając poziom fukozytacji w komórkach za pomocą lektyny LCA (wiąże się do glikanów zawierających w swojej strukturze fukozę przyłączoną wiązaniem  $\alpha$ 1-6 glikozydowym [21]) sprzężonej ze znacznikiem fluorescencyjnym FITC. Poziom lektyny LCA-FITC związanej z komórkami Me45 oznaczono za pomocą cytometru. Oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach.

## 3. Wyniki

Na rysunku 2 przedstawiono względną zmianę ekspresji FUT8 w komórkach transfekowanych poszczególnymi miR-maskami. Można zauważyć, że obecność maski

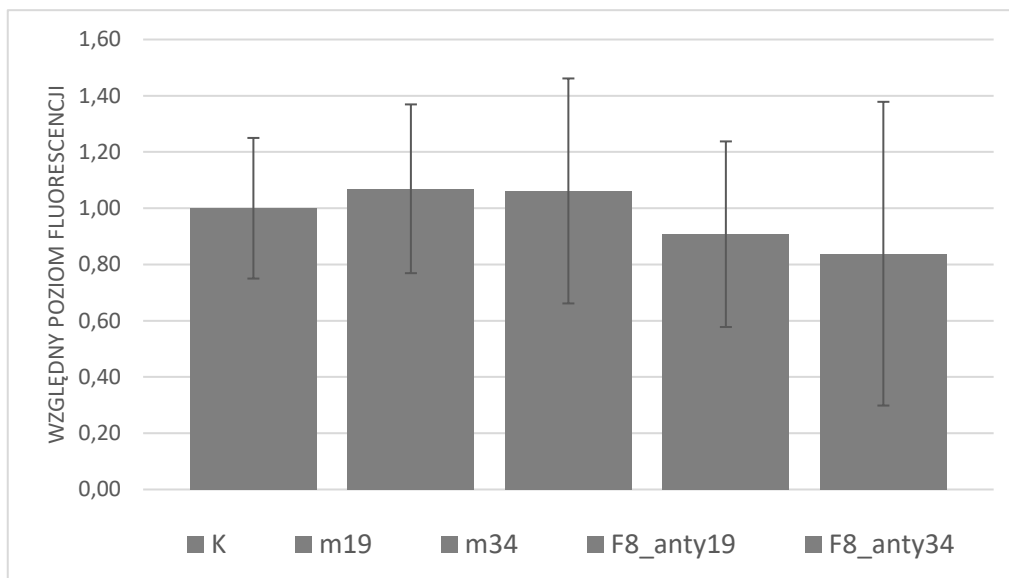
m19, komplementarnej do miejsca wiązania miR-19 w sekwencji mRNA\_FUT8, powoduje ponad dwukrotny wzrost poziomu ekspresji FUT8. Podobny efekt wywołuje maska m34 blokująca działanie miR-34, które to miRNA jest znanym regulatorem ekspresji FUT8. Uzyskany wynik sugeruje, że miR-19a, podobnie jak miR-34, wpływa na poziom ekspresji FUT8. Co interesujące, działanie masek o sekwencji w pełni komplementarnej do sekwencji mRNA\_FUT8 (F8\_anty19, F8\_anty34) jest w obu przypadkach słabsze niż w przypadku masek częściowo komplementarnych (m19, m34). Być może wynika to ze struktury mRNA\_FUT8, ale jest to hipoteza, która wymaga eksperymentalnego potwierdzenia.



Rys.2. Poziom ekspresji FUT8 w komórkach Me45 transfekowanych miR-maską (m19, m34, F8\_anty19, F8\_anty34) lub w komórkach kontrolnych (nie-transfekowanych). Analizę wykonano metodą delta-delta ct z wykorzystaniem genu RPL41 jako genu referencyjnego. Na wykresie zaznaczono odchylenie standardowe.

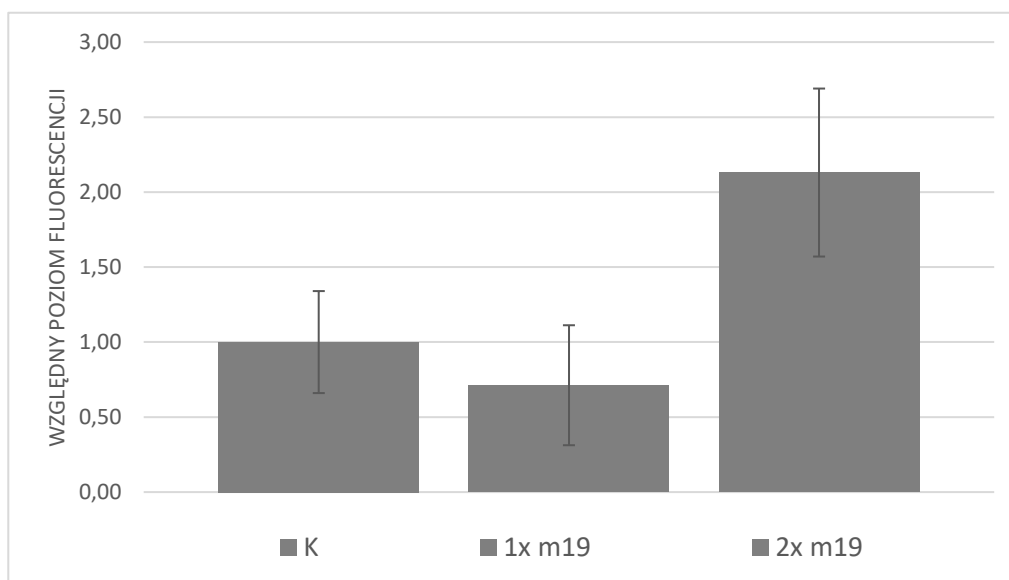
Oznaczenie ilości lektyny LCA związanej do komórek Me45 wykonywano za pomocą cytometru przepływowego. Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 3. Komórki Me45 transfekowane maskami m19 i m34 wykazują lekki wzrost ilości związanej lektyny LCA, ale rozrzut uzyskanych wyników nie pozwala stwierdzić, że obserwowany efekt jest istotny. Brak znaczącego efektu zmiany w ilości związanej lektyny LCA do komórek Me45, mimo wzrostu poziomu transkryptu FUT8 (rys. 2), może wynikać z dwóch powodów: (1) poziom transkryptu nie zawsze odzwierciela jednoznacznie poziom białka, gdyż translacja transkryptu może być zahamowana [23], (2) lektyna LCA oprócz wiązania się do fukozy przyłączonej wiązaniem  $\alpha$ 1-6 glikozydowym rozpoznaje również mannozę przyłączoną wiązaniem  $\alpha$ -glikozydowym [18]. LCA, ze względu na preferencyjne wiązanie się do  $\alpha$ 1-6 fukozy, jest standardowo wykorzystywana do badania aktywności FUT8 [9]. Żeby więc zweryfikować, czy wprowadzenie do komórki maski m19 rzeczywiście wpływa na stopień fukozytacji komórek wykonano dodatkowe badanie, w którym komórki Me45 transfekowano standardową ilością (3pmol) m19 (1x m19) lub dwa razy większą ilością (6pmol) m19

(2x m19). Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 4. Zwiększenie ilości maski m19 wprowadzonej do komórek Me45 zintensyfikowało efekt działania maski m19 w komórkach powodując prawie dwukrotny wzrost ilości lektyn LCA związanych do komórek Me45. Obserwowany efekt jest więc wprost proporcjonalny do ilości maski m19 wprowadzonej do komórek i sugeruje, że maska m19 indukuje wzrost ilości FUT8



w komórkach.

Rys. 3. Poziom fluorescencji komórek Me45 znakowanych lektyną LCA sprzężoną z FITC. Wyniki znormalizowano do kontroli (komórek nietransfekowanych). Na wykresie zaznaczono odchylenie standardowe.



Rys.4. Poziom fluorescencji komórek Me45 transfekowanych różną ilością maski m19. Wyniki znormalizowano do kontroli (komórek nietransfekowanych). Na wykresie zaznaczono odchylenie standardowe. 1x m19: komórki transfekowane 3pmol m19; 2x m19: komórki transfekowane 6pmol m19.

#### 4. Podsumowanie

Zmienioną ekspresję miR-19a obserwuje się w wielu typach nowotworów. MiR-19a bierze udział w indukcji proliferacji i migracji komórek nowotworowych i jest często nadekspresjonowany u pacjentów ze zdiagnozowanym złośliwym nowotworem [2]. Rozpatrywany jest więc jako potencjalny biomarker progresji nowotworów. Co więcej stwierdzono, że komórki czerniaka wydzielają eksosomy wzbogacone w miR-19a i to miRNA promuje powstawanie lekoopornych komórek czerniaka [14]. Również poziom ekspresji FUT8 powiązано z agresywnością i opornością na leczenie czerniaka [19]. W oparciu o dane dostępne w bazie miRPathDB v2.0 [10] stwierdzono, że mRNA\_FUT8 posiada potencjalne miejsce wiązania miR-19a. Ponieważ poziom FUT8, podobnie jak miR-19a, powiązany jest ze stopniem złośliwości czerniaka i obie te cząsteczki rozpatrywane są zarówno jako potencjalny cel terapii jak i biomarker skuteczności leczenia [4; 14] wydawało się interesujące, sprawdzenie, czy miR-19a może regulować ekspresję FUT8. W ramach niniejszej pracy wykazano, że zablokowanie miejsca wiązania miR-19a zwiększa poziom mRNA FUT8 w komórkach Me45 i jest to efekt porównywalny do działania oligonukleotydu maskującego miejsce wiązania miRNA o znanym oddziaływaniu z mRNA\_FUT8 (miR-34) do FUT8. Co więcej wprowadzenie do komórki maski m19 powoduje zwiększenie ilości glikanów zawierających fukozę przyłączoną wiązaniem  $\alpha$ 1-6 glikozydowym i jest to efekt zależny od stężenia m19. Ponieważ FUT8 jest jedynym enzymem katalizującym przyłączenie fukozy wiązaniem  $\alpha$ 1-6 glikozydowym uzyskane wyniki sugerują, że miR-19a reguluje ekspresję FUT8. Przedstawione w pracy wyniki jako pierwsze wskazują, że miR-19a jest zaangażowany w regulację ekspresji FUT8, ale w celu jednoznacznego potwierdzenia regulacji wymagane są dalsze badania.

Poznanie nowego elementu regulującego poziom ekspresji FUT8 pozwoli lepiej zrozumieć przyczynę zmian ekspresji FUT8 w komórkach, co może znaleźć odzwierciedlenie w wykorzystaniu FUT8 zarówno w diagnostyce jak i leczeniu nowotworów. Jest to o tyle istotne, że miR-19a jest powiązany z aktywnością białka p53, które to białko, podobnie jak FUT8, wpływa na ekspresję białek związanych z naprawą DNA.

*Praca finansowana w ramach 02/040/BK\_24/1056 oraz 2022/45/B/NZ2/03599 (OPUS, NCN).*

#### LITERATURA

1. Agrawal P, Fontanals-Cirera B, Sokolova E, Jacob S, Vaiana CA, Argibay D, Davalos V, McDermott M, Nayak S, Darvishian F, Castillo M, Ueberheide B, Osman I, Fenyö D, Mahal LK, Hernando E.: A Systems Biology Approach Identifies FUT8 as a Driver of Melanoma Metastasis., *Cancer Cell.*, 2017, vol. 31(6), p. 804-819.e7.
2. Ardizzone A, Calabrese G, Campolo M, Filippone A, Giuffrida D, Esposito F, Colarossi C, Cuzzocrea S, Esposito E, Paterniti I.: Role of miRNA-19a in Cancer Diagnosis and Poor Prognosis., *Int J Mol Sci.*, 2021, vol. 22(9), p. 4697.

3. Beyer S, Fleming J, Meng W, Singh R, Haque SJ, Chakravarti A.: The Role of miRNAs in Angiogenesis, Invasion and Metabolism and Their Therapeutic Implications in Gliomas., *Cancers (Basel)*., 2017, vol.9(7), p. 85.
4. Chen XJ, Liu S, Han DM, Han DZ, Sun WJ, Zhao XC, Liang JQ, Yu L.: FUT8-AS1 Inhibits the Malignancy of Melanoma Through Promoting miR-145-5p Biogenesis and Suppressing NRAS/MAPK Signaling., *Front Oncol.*, 2021, vol. 10, p. 586085.
5. Cheng L, Gao S, Song X, Dong W, Zhou H, Zhao L, Jia L.: Comprehensive N-glycan profiles of hepatocellular carcinoma reveal association of fucosylation with tumor progression and regulation of FUT8 by microRNAs., *Oncotarget.*, 2016, vol. 7(38), p. 61199-61214.
6. García-García A, Serna S, Yang Z, Delso I, Taleb V, Hicks T, Artschwager R, Vakhrushev SY, Clausen H, Angulo J, Corzana F, Reichardt NC, Hurtado-Guerrero R.: FUT8-Directed Core Fucosylation of N-glycans Is Regulated by the Glycan Structure and Protein Environment., *ACS Catal.*, 2021, vol. 11(15), p. 9052-9065.
7. Gencia I, Baderca F, Avram S, Gogulescu A, Marcu A, Seclaman E, Marian C, Solovan C.: A preliminary study of microRNA expression in different types of primary melanoma., *Bosn J Basic Med Sci.*, 2020, vol. 20(2), p. 197-208.
8. He M, Zhou X, Wang X.: Glycosylation: mechanisms, biological functions and clinical implications., *Signal Transduct Target Ther.*, 2024, vol. 9(1), p. 194.
9. Huang Y, Zhang HL, Li ZL, Du T, Chen YH, Wang Y, Ni HH, Zhang KM, Mai J, Hu BX, Huang JH, Zhou LH, Yang D, Peng XD, Feng GK, Tang J, Zhu XF, Deng R.: FUT8-mediated aberrant N-glycosylation of B7H3 suppresses the immune response in triple-negative breast cancer., *Nat Commun.*, 2021, vol. 12(1), p. 2672.
10. Kehl T, Kern F, Backes C, Fehlmann T, Stöckel D, Meese E, Lenhof HP, Keller A.: miRPathDB 2.0: a novel release of the miRNA Pathway Dictionary Database., *Nucleic Acids Res.*, 2020, vol. 48(D1), p. D142-D147.
11. Li J., Hsu H-C., Mountz J.D., Allen J.G.: Unmasking fucosylation: from cell adhesion to immune system regulation and diseases. *Cell Chemical Biology*, 2018, vol.25, p.499-512
12. Lin Y., Lubman D.M.: The role of N-glycosylation in cancer. *Acta Pharmaceutica Sinica B.*, 2024, vol.14(3), p. 1098-1110
13. López-Cortés R, Muinelo-Romay L, Fernández-Briera A, Gil Martín E.: High-Throughput Mass Spectrometry Analysis of N-Glycans and Protein Markers after *FUT8* Knockdown in the Syngeneic SW480/SW620 Colorectal Cancer Cell, Model. *J Proteome Res.*, 2024, vol. 23(4), p. 1379-1398
14. Luan W, Lu X, Peng H, Shen X, Rao M, Ruan H.: Exosomal miR-19a derived from melanoma cell promotes the vemurafenib resistance of malignant melanoma through directly targeting LRIG1 to reactivate AKT and MAPK pathway., *Pathol Res Pract.*, 2024, vol. 260, p. 155410.
15. Mao C, Li J, Feng L, Gao W.: Beyond antibody fucosylation:  $\alpha$ -(1,6)-fucosyltransferase (Fut8) as a potential new therapeutic target for cancer immunotherapy., *Antib Ther.*, 2023, vol. 6(2), p. 87-96.

16. Mereiter S., Balmana M., Campos D., Gomes J., Reis C.A.: Glycosylation in the era of cancer-target therapy: Where are we heading? *Cancer Cell*, 2019, vol. 36, p. 6-16
17. Peng Y, Croce CM.: The role of MicroRNAs in human cancer., *Signal Transduct Target Ther.*, 2016, vol. 1, p. 15004.
18. Shilova NV, Galanina OE, Polyakova SM, Nokel AY, Pazynina GV, Golovchenko VV, Patova OA, Mikshina PV, Gorshkova TA, Bovin NV.: Specificity of widely used lectins as probed with oligosaccharide and plant polysaccharide arrays., *Histochem Cell Biol.*, 2024.
19. Shen L, Xia M, Deng X, Ke Q, Zhang C, Peng F, Dong X, Luo Z.: A lectin-based glycomic approach identifies FUT8 as a driver of radioresistance in oesophageal squamous cell carcinoma., *Cell Oncol (Dordr.)*, 2020, vol. 43(4), p. 695-707.
20. Shi M, Nan X-R, Liu B-Q. The Multifaceted Role of FUT8 in Tumorigenesis: From Pathways to Potential Clinical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25(2):1068.
21. Tu CF, Li FA, Li LH, Yang RB. Quantitative glycoproteomics analysis identifies novel FUT8 targets and signaling networks critical for breast cancer cell invasiveness. *Breast Cancer Res*. 2022 Mar 18;24(1):21.
22. Wu C., Li J., Lu L., Li M., Yuan Y., Li J.: OGT and OGA: Sweet guardians of the genome. *J Biol Hem* 2024 Apr;300(4):107141.
23. Xie Y, Shu T, Liu T, Spindler MC, Mahamid J, Hocky GM, Gresham D, Holt LJ. Polysome collapse and RNA condensation fluidize the cytoplasm. *Mol Cell*. 2024 Jul 25;84(14):2698-2716.e9.