

## FUMARAZA CITOSOLICĂ CA SUPRESOR TUMORAL

Veronica Sardari, Leonid Lîsîi, Alina Albu

Catedra Biochimie și Biochimie Clinică, USMF „Nicolae Testemițanu”

### Summary

#### *Cytosolic fumarase as tumor suppressor*

It was found that cytosolic fumarase is less involved in the tricarboxylic acid cycle, compared with the mitochondrial one. The study shows exciting connection between primary metabolism (represented by fumarase and fumaric acid) and the DNA damage response. In the absence of fumarase in the cells, its function in DNA repair may be substituted by high concentrations of fumaric acid. It suggests that cytosolic fumarase is not a DNA repair enzyme/protein, but plays an important role in the detection or repair of DNA damage, mainly of DNA double-strand breaks (DSBs). This explains its tumor suppressor activity and the possibility of cancer prevention and treatment. The review reflects the scientific results in this field.

### Rezumat

S-a constatat că fumaraza citosolică este mai puțin implicată în funcționarea ciclului acizilor tricarboxilici, comparativ cu cea mitocondrială. Studiul relevă legătura dintre metabolismul primar (reprezentat de fumarază și acidul fumaric) și răspunsul celular la erorile de la nivelul DNA-ului. La absența fumarazei în celule, funcția sa în repararea DNA-ului poate fi completată de concentrații ridicate de acid fumaric. Se sugerează faptul că, fumaraza citosolică nu este o enzimă/proteină ce participă direct la repararea DNA-ului, dar joacă un rol important în detectarea sau restabilirea unor erori apărute în structura DNA-ului, îndeosebi a rupturilor bicatenare, fapt ce explică activitatea sa de supresor tumoral, putând fi implicată în prevenirea și tratamentul cancerului. Analiza dată reflectă rezultatele științifice în domeniul dat.

### Actualitatea

Datele statistice arată că în Republica Moldova, ca și în majoritatea țărilor europene, incidența cancerului este într-o ascensiune continuă. Ca cauză a mortalității și invalidității cancerul ocupă locul doi, după afecțiunile cardiovasculare [Mereuță Ion, 2002]. Cancerul pulmonar se plasează pe primul loc după numărul de decese din toate tipurile de cancer. Incidența cancerului pulmonar este 34.8 pentru bărbați și 5.5 pentru femei la 100000. Cancerul glandei mamare ocupă primul loc în structura morbidității cancerului la populația feminină (31-36%). Incidența cancerului gastric este 9-17 la 100000 la bărbați și 5-6 la 100000 la femei, iar cel colorectal are o frecvență de 7% la populația masculină și 5,2% - printre femei, în timp ce cancerul vezicii biliare reprezintă 1,3% și 5,2% corespunzător. În structura morbidității prin tumori maligne, la copii predomină 3 localizări de bază: hemoblastozele - 43,7%, tumorile țesuturilor moi și oaselor - 20,3% și afecțiunile tumorale ale creierului-14,1%. Aceasta e cauzată nu numai de morbiditatea înaltă, originea ei multifactorială, dar și de diagnosticul tardiv cu lipsa unui tratament adecvat.

În prezent **cancerul** este definit ca o categorie de boli caracterizate printr-o diviziune necontrolată a celulelor și capacitatea acestor celule de a invada alte țesuturi din organism, fie prin creștere directă în țesuturi adiacente (invazie) sau prin migrația celulelor spre locuri mai îndepărtate în organism (metastază). Această creștere necontrolată este cauzată de anormalități în DNA, cum ar fi mutații ale genelor care controlează înmulțirea celulelor. Una sau, frecvent, mai multe astfel de mutații pot duce la diviziunea și înmulțirea necontrolată a celulelor și formarea unei tumori.

Cancerul este o boală în care anumite celule din organism încetează să mai funcționeze normal. Aceste noi celule mutante (cancerigene) încep să se multiplice necontrolat. Simultan, se dezvoltă propria rețea de vase sanguine, conducând treptat la formarea unei tumori - proces accelerat, haotic de creștere și dezvoltare necontrolată și eronată a celulelor afectate. Examine

la microscop, ele prezintă o configurație și structură anormală – o totală dezordine biologică (Vezi fig.1 ( Barbăroșie L., 2012 )).

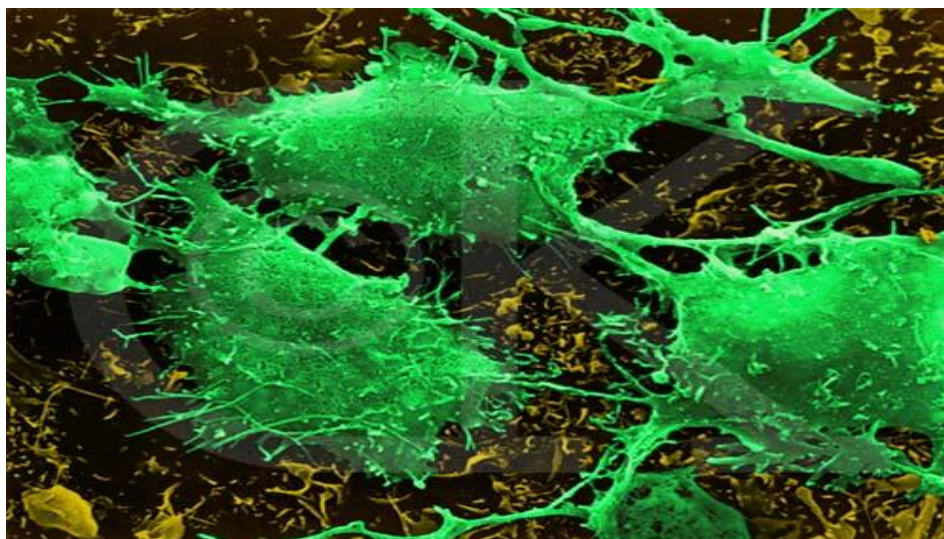
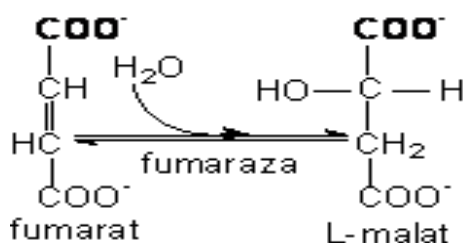


Fig. 1. Imagine electronică a unei celule canceroase. Examine la microscop, celulele canceroase prezintă o configurație și o structură anormală, dezorganizată, există mai multe celule aflate în mitoză față de țesuturile normale, prezintă hiperchromatism [Barbăroșie L., 2012].

La apariția și dezvoltarea cancerului, concurează o multitudine de factori interdependenți, dar preponderent grație unor modificări sau rearanjări la nivelul informației genetice stocate în DNA-ul fiecărei celule, în două etape: inițierea și promovarea. Factorii cancerigeni de inițiere interacționează nemijlocit cu DNA-ul celular și pot fi ca: fumul de țigară, poluarea mediului ambiant, pesticidele, metalele grele, produsele chimice industriale, virușii, radiațiile, radicalii liberi, hormonii (mai ales estrogeni) [Bran C., 2011].

Fumaraza (numită și fumarat hidratata) este o enzimă care se găsește la eucariote atât în matricea mitocondrială, cât și în citosol [Tuboi S., 1990]. În ultimii ani, cercetătorii și-au focusat atenția asupra investigării funcțiilor acesteia. În condiții fiziologice, fumaraza mitocondrială, este o enzimă implicată în generarea de energie, catalizând reversibil reacția de hidratare a acidului fumaric în acid L-malic (ciclul Krebs).



Acidul fumaric este un acid dicarboxilic nesaturat, care prezintă izomerie tip cis/trans. Funcțiile izoenzimei citosolice sunt puțin cunoscute. Se crede că la drojdii, enzima funcționează drept „scavenger” pentru fumarat, provenit din ciclul ureei și din catabolismul unor aminoacizi [Ratner S., 1953; Sass E., 2001].

La oameni, cât și la drojdii o singură genă codifică fumaraza, însă mecanismul ei de distribuție între citosol și mitocondrie nu este încă elucidat. Studii recente estimează că absența fumarazei din citoplasmă este legată de apariția unor tumori în cadrul unui sindrom numit Leiomiomatoză ereditară și în Cancer Celular Renal (Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer – HLRCC), caracterizându-se prin apariția unor carcinoame la nivelul celulelor renale –

leiomiomelor cutanate și uterine, și a leiomiosarcomelor uterine [Launonen V., 2001; Tomlinson I.P., 2002]. În majoritatea cazurilor de HLRCC a fost detectată o inactivare bi-alelică, ceea ce a generat ipoteza conform căreia această enzimă ar putea acționa ca supresor tumoral [Launonen V., 2001; Tomlinson I.P., 2002]. Recent a fost sugerată ideea că, inhibiția fumarazei conduce la creșterea concentrației intracelulare de fumarat, care la rândul său acționează ca inhibitor competitiv al prolilhidroxilazei - factor inductibil al hipoxiei (HIF). Fumaratul stabilizează acest factor prin prevenirea degradării sale proteasomale. HIF este un factor de transcripție ce amplifică expresia genelor reglatoare ale angiogenezei, precum VEGF, care conduce la densitate microvasculară crescută și tumorigeneză [Gottlieb E., 2005; Lynch A.M., 2006; Sudarshan S., 2007] (fig.2).

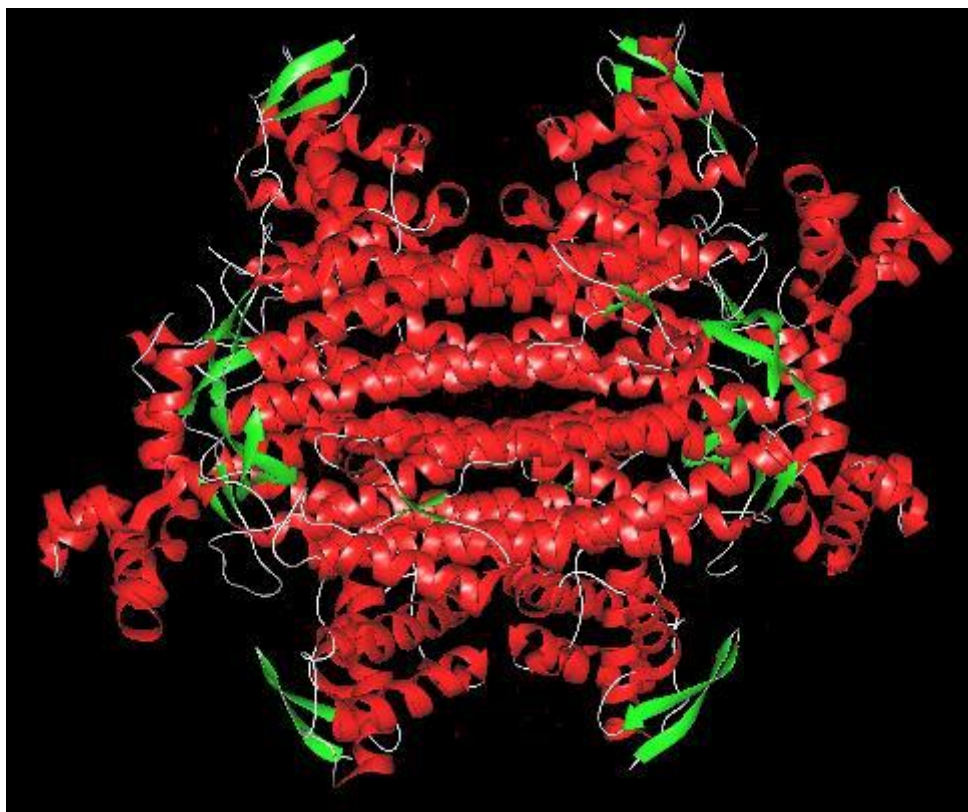


Fig. 2. Structura secundară a fumarazei umane [Munteanu C., 2011].

### Materialul și metodele

Pentru identificarea funcției citosolice a fumarazei la drojdii, cercetătorii Ohad Yogev și Esti Singer de la Catedra de Microbiologie și Genetică Moleculară a Facultății de Medicină din Ierusalim, împreună cu Machal Goldberg din cadrul Catedrei de Biologie Moleculară a Cornell University (New York – SUA) au folosit o metodă de sinteză a genelor în doi pași [Young L., 2004], cu scopul de a exprima fumaraza din genomul mitocondrial, astfel încât să nu existe dubii în absența celei citosolice. Metoda presupune folosirea recombinării și transformării omoloage, atât în cazul genomului nuclear cât și a celui mitocondrial. S-au obținut astfel linii celulare de drojdii în care gena *FUM1* a fost îndepărtată, în timp ce proteina citosolică a fost exprimată de către o versiune modificată a acestei gene numită *FUM1<sup>m</sup>* (obținută din genomul mitocondrial al celulei). Noua linie celulară de drojdii obținută a fost selecționată prin posibilitatea acestor celule de a crește pe un mediu de galactoză, sau pe un mediu cu surse nefermentative de carbon (glicerol), ceea ce a fost folosit ca indicator pentru funcționalitatea ciclului acizilor tricarboxilici [Yogev O., 2010].

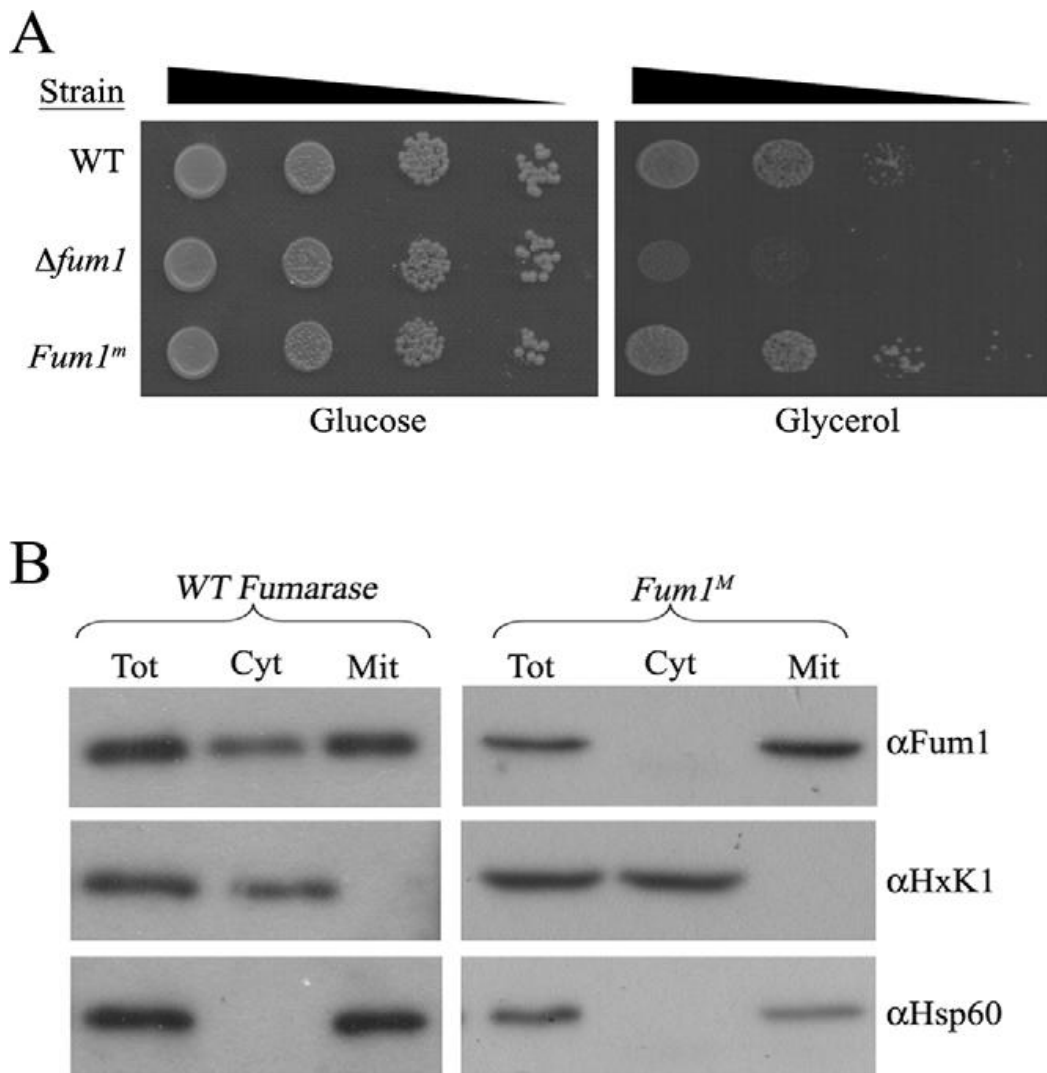


Fig. 3. Expresia fumarazei din genomul mitocondrial. (A) Fumaraza mitocondrială este activă enzimatic. Tulpinile WT,  $\Delta fum1$  și  $\Delta fum1/Fum1^m$  ( $Fum1^m$ ) erau diluate în serii ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) și crescute pe mediul fermentativ cu glucoză sau nefermentativ cu glicerol.

(B) Fumaraza mitocondrială este în exclusivitate localizată în mitocondrii. Tulpinile WT și  $Fum1^m$  au fost supuse fracționării subcelulare. Porțiuni echivalente a fracțiunilor totale (Tot), citosolice (Cyt) și mitocondriale (Mit) au fost analizate prin Western blot folosind anticorpi indicatori. Hsp60 și HxK1 au fost utilizați ca markeri pentru mitocondrie și, respectiv, citosol. [Yogev O., 2010].

Celulele modificate genetic au fost studiate în condiții variabile de temperatură, lumină, radiații, nutrienți etc. Cercetătorii au relevat că, celulele au prezentat o sensibilitate mărită la radiații din domeniul infraroșu (IR) și la prezența în cantitate sporită a hidroxiureei în mediul de cultură. Radiațiile din domeniul IR determină apariția rupturilor ale catenei duble de DNA și hidroxiureea inhibă sinteza de DNA. Hidroxiureea este o substanță inhibitoare a ribonucleotid reductazei, iar prezența sa poate induce blocarea furcii de replicare, ceea ce favorizează apariția unor erori în replicarea DNA. Acest fapt denotă o susceptibilitate mărită a drojdiilor în absența izoenzimei mitocondriale.

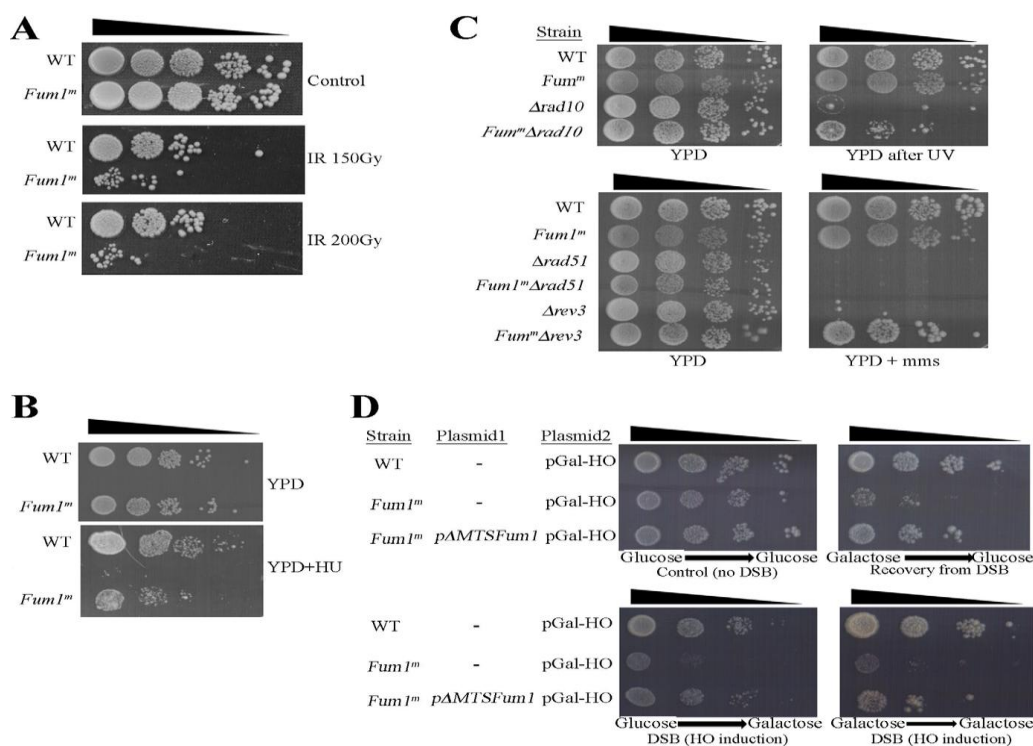


Fig. 4: Tulpina  $\Delta fum1/Fum1^m$  ( $Fum1^m$ ) sensibilă la deteriorarea ADN-ului. (A) WT și  $Fum1^m$  au fost expuse la IR și apoi diluate în serie pe plăci YPD. (B) Drojdia a fost diluată în serie, pe plăci YPD, conținând hidroxiureea. (C) Fumaraza citosolică suprimă manifestarea fenotipurilor  $\Delta rev3$  și  $\Delta rad10$ . (D) Tulpinile au fost crescute la faza logaritmică într-un mediu de glucoză sau galactoză și apoi diluate în serie pe plăci cu mediu de glucoză sau galactoză [Yogev O., 2010].

Pentru o mai bună înțelegere a mecanismelor implicate, s-au creat linii celulare modificate genetic, atât prin absența genei  $FUM1^m$ , cât și prin absența unor gene răspunzătoare de repararea DNA. Rezultatele au arătat o creștere a sensibilității materialului genetic la radițiile UV. Cercetătorii au estimat în momentul exprimării fumarazei citosolice reversibilitatea procesului la apariția unor erori la nivelul DNA. Prin modificarea genei corespunzătoare de biosinteza izoenzimei citosolice, astfel încât doar un singur aminoacid de la nivelul situsului catalitic al enzimei să fie modificat, s-a constatat inactivarea enzimei [Yogev O., 2010].

Cu scopul de a verifica dacă acidul malic sau acidul fumaric, prezintă un rol în răspunsul la apariția de erori la nivelul DNA, cercetătorii au folosit culturi ce aveau în componența sa gena  $FUM^m$  (în culturi cu glucoză sau galactoză (pentru selecție), în prezența esterilor corespunzători: monoetil-fumarat sau dietil-fumarat). Prin folosirea esterilor, este facilitată preluarea lor la nivel celular, unde sunt biotransformați în acizii corespunzători.

Prin expunerea celulelor microorganismelor la o cantitate mare de hidroxiuree, folosind analiza Western blot, s-a remarcat nivelul mai mare al concentrației de fumarază [Yogev O., 2010]. Folosind linii celulare HeLa, cercetătorii au observat că același lucru este valabil și în cazul organismelor eucariote complexe, așa cum este omul.

Pentru a susține ipoteza nominalizată savanții în cauză au verificat și localizarea intracelulară a fumarazei în urma expunerii unor culturi de celule eucariote la hidroxiuree și IR, iar apoi au evaluat culturile utilizând microscopia confocală imunofluorescentă [Yogev O., 2010].



## Rezultatele și analiza lor

Experimentele au fost efectuate de către Ohad Yogev și Esti Singer de la Catedra de Microbiologie și Genetică Moleculară a Facultății de Medicină din Ierusalim, împreună cu Machal Goldberg din cadrul Catedrei de Biologie Moleculară a Cornell University (New York – SUA). Savanții nominalizați au relevat că, plierea rapidă a fumarazei împiedică transferul ei în mitocondrie [ 2010].

În rezultatul cercetărilor s-a sugerat că, la deficiența fumarazei citozolice rezultă o sensibilitate crescută a drojdiilor la rupturi ale catenei duble de DNA și o restabilire mai puțin eficientă în urma acestor erori.

Rezultatele au demonstrat că în ambele cazuri (folosind atât hidroxiuree cât și IR) concentrația intranucleară a fumarazei este mai mare. S-a observat că inițial această enzimă este localizată la nivel mitocondrial și citoplasmatic, însă pe măsura timpului de la inducerea degradării DNA, concentrația fumarazei din nucleul celular crește. În nucleu fumaraza produce local acid fumaric (din acid malic), care joacă rol în detectarea, reglarea și/sau stabilitatea defectelor lui DNA.

Studiile constată existența unei corelații indirecte între procesul de formare al tumorilor și nivelul de fumarat intracelular. Aceasta a favorizat versiunea că enzima citoplasmatică are un rol semnificativ în repararea rupturilor catenei duble de DNA în nucleu. Acest fapt presupune deplasarea fumarazei din citoplasmă în nucleu. Surprinzător, atunci când fumaraza este absentă în celule, funcția sa în repararea DNA-ului poate fi completată de concentrații ridicate de acid fumaric, spre deosebire de acidul malic, prin a cărui adaus în mediul de cultură nu au fost corectate erorile apărute la nivelul DNA-ului. Acest fapt ne sugerează ideea că, conversia malatului la fumarat este funcția relevantă a fumarazei în nucleu.

Deficitul de fumarază conduce la apariția cancerului, deoarece nu este suficient acid fumaric în nucleu, pentru a stimula repararea rupturilor catenei duble de DNA, iar persistența acestor catene se crede că are rol de inductor.

Astfel, investigațiile relatate sugerează că, fumaraza și acidul fumaric sunt elemente-cheie ale răspunsului la deteriorarea DNA-ului - supresor tumoral în celulele umane. În baza acestor investigații se denotă faptul că, deficitul de fumarază conduce la cancer, la persistența acestor catene modificate. Studiul dat relevă o legătură semnificativă între metabolismul primar și răspunsul celulelor la deteriorarea DNA-ului.

Autorii au ajuns la următoarele **concluzii**:

1. Fumaraza citosolică este mai puțin implicată în funcționarea ciclului acizilor tricarboxilici, comparativ cu cea mitocondrială. Se relevă o legătură captivantă dintre metabolismul primar (reprezentat de enzima fumaraza și metabolitul său) și răspunsul celular la erorile de la nivelul DNA-ului - propagarea tumorilor ar putea fi controlată la nivel metabolic.

2. S-a constatat că, fumaraza citosolică poate fi substituită prin complementaritate de către acidul fumaric. Adăugarea acidului malic în mediul de cultură nu corectează erorile apărute la nivelul DNA-ului. Se estimează rolul fumarazei citosolice în protecția față de erorile DNA-ului, care este mediat de către activitatea sa catalitică privind formarea acidului fumaric - confirmat și prin faptul că fumaraza umană e activă în celulele de drojdie.

3. Autorii concluzionează că, fumaraza citosolică nu este o enzimă/proteină ce participă direct la repararea DNA-ului, dar joacă mai degrabă un rol important în detectarea sau restabilirea unor erori apărute în structura DNA-ului, îndeosebi a rupturilor bicatenare. Activitatea sa de supresor tumoral poate fi aplicată în prevenirea și tratamentul cancerului.

## Bibliografie

1. Barbăroșie L., Interviu cu Victor Cernat, directorul Institutului Oncologic: *Depistarea timpurie a cancerului*, Chișinău, 6 iunie 2012, Radio Europa Liberă.
2. Bran C. *Cancerul - definiție, cauze, tratament, profilaxie*, Brăila, 2011, 12 p.

3. Gottlieb E., Tomlinson I.P. *Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update*. Nat. Rev. Cancer, 2005, vol.5, p.857-866.
4. Launonen V., Vierimaa O., Kiuru M., et al. *Inherited susceptibility to uterine leiomyomas and renal cell cancer*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2001, vol.98, p.3387-3392.
5. Lynch A.M, Morton C.C: *FH (fumarate hydratase)*. Oncol. Haematol., 2006, vol. 10, no.4, p. 216-217.
6. Mereuță Ion. *REGLEMENTAREA SERVICIULUI ONCOLOGIC ÎN REPUBLICA MOLDOVA*, Chișinău, 2002, p. 5.
7. Munteanu C. *Ar putea fi implicată fumaraza în prevenirea cancerului?* "MedicalStudent", România, 15 noiembrie 2011.
8. Ratner S., Anslow W.P., Petrack B. *Biosynthesis of urea. VI. Enzymatic cleavage of argininosuccinic acid to arginine and fumaric acid*. J. Biol. Chem., 1953, vol. 204, p.115-125.
9. Sass E., Blachinsky E., Karniely S., Pines O. *Mitochondrial and cytosolic isoforms of yeast fumarase are derivatives of a single translation product and have identical amino termini*. J. Biol. Chem. 2001, vol. 276, p.46111-46117.
10. Sudarshan S., Linehan W.M., Neckers L. *HIF and fumarate hydratase in renal cancer*. Br. J. Cancer, 2007, vol.96, p.403-407.
11. Tomlinson I.P., Alam N.A., Rowan A.J., et al. *Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer*. Nat. Genet., 2002, vol.30, p.406-410.
12. Tuboi S., Suzuki T., Sato M., Yoshida T. *Rat liver mitochondrial and cytosolic fumarases with identical amino acid sequences are encoded from a single mRNA with two alternative in-phase AUG initiation sites*. Adv. Enzyme Regul. 1990, vol. 30, p.289-304.
13. Yogev O., Yogev O., Singer E., et al. *Fumarase: a mitochondrial metabolic enzyme and a cytosolic/nuclear component of the DNA damage response*. PLoS Biology, 2010, vol. 8,no.3, p.1-13.
14. Young L., Dong Q. *Two-step total gene synthesis method*. Nucleic Acids Res., 2004, vol.32, p.59.

## INFLUENȚA COMPUȘILOR COORDINATIVI AI CUPRULUI ASUPRA ACTIVITĂȚII PROTEAZELOR LIZOZOMALE RENALE LA ȘOBOLANI ADULȚI

**Olga Știrba, Olga Tagadiuc, Lilia Andronache, Veronica Sardari, Valentin Gudumac**  
Laborator Biochimie, USMF "Nicolae Testemițanu"

### Summary

#### *Influence of the copper coordination compounds on the activity of renal lysosomal proteases in adult rats*

The aim of the study was to investigate the influence of copper coordination compounds CMT-28, CMT-67 and their combinations with the cyanobacterial remedy BioR on the activity of lysosomal proteases (LP) in the kidneys of intact rats. It was established that all substances studied differently influence the activity of cathepsins D, G, L, H, B and leucineaminopeptidase in male and female rats. CMT-67 shows the highest increase of LP renal activity, and the combination with BioR only induces a significant increase of cathepsine H activity. CMT-28 slightly enhances the renal activity LP and the combination with BioR does not potentiate this effect.