

Tytuł pracy: „Ocena właściwości chemoprewencyjnych kompleksów węglowodanowo-białkowych izolowanych z *Boletus edulis* (borowik szlachetny). Badania *in vitro* i molekularne w modelu komórek raka okrężnicy”

Promotor: Prof. dr hab. Wojciech Rzeski

## STRESZCZENIE

Rak jelita grubego stanowi jedną z najczęstszych przyczyn zgonów na nowotwory złośliwe na świecie, w tym również w Polsce. Zapadalność na to schorzenie ciągle się zwiększa, dlatego wciąż poszukuje się nowych, skuteczniejszych metod walki z nim. Ponieważ w warunkach naturalnych proces karcynogenezy, a zwłaszcza etap promocji guza trwa zwykle od kilku do kilkudziesięciu lat, jest to okres dostatecznie długi na zastosowanie środków zaradczych (chemoprewencyjnych), w tym na przyjmowanie związków zdolnych zahamować lub wręcz zatrzymać proces nowotworzenia.

Ze względu na możliwość długotrwałego, bezpiecznego stosowania oraz udowodniony, korzystny wpływ na organizm człowieka, obiecującą i ważną grupę substancji o chemoprewencyjnych właściwościach stanowią produkty pochodzenia naturalnego, a w szczególności składniki pożywienia. Wśród nich na szczególną uwagę zasługują grzyby jadalne z gromady *Basidiomycota*, które jak wykazały liczne badania stanowią bogate źródło substancji biologicznie aktywnych, w tym o działaniu przeciwnowotworowym. Właściwości chemoprewencyjne przypisywane są przede wszystkim polisacharydom i ich białkowym pochodnym. Możliwości ich wykorzystania w terapii nowotworów są ogromne i bazują na ich zdolności do stymulacji układu odpornościowego, jak również zdolności do hamowania proliferacji komórek nowotworowych czy indukcji apoptozy.

Spośród olbrzymiej gromady *Basidiomycota*, do tej pory jedynie z kilku gatunków zostały wyizolowane i szczegółowo scharakteryzowane polisacharydy i ich pochodne o właściwościach przeciwnowotworowych. Wyniki tych badań zaowocowały wprowadzeniem na rynek trzech komercyjnych preparatów: lentinan, krestin i shizophyllan, które od blisko 50 lat są z powodzeniem stosowane w terapii różnego typu nowotworów. Zainteresowanie badaczy wzbudził również *Boletus edulis*. Lucas i wsp. już w 1957 roku wykazali skuteczność ekstraktów z owocników borowika w terapii raka u myszy. 20 lat później Ohtsuka i wsp., potwierdzili przeciwnowotworowe właściwości frakcji polisacharydowych pozyskiwanych z tego grzyba w stosunku do guza Erlicha i Sarkomy 180 u myszy. Pomimo obiecujących wyników, od tamtych czasów nikt nie podjął się próby izolacji z prawdziwka polisacharydów i ich pochodnych oraz charakterystyki ich aktywności biologicznej. Nie oceniano również potencjału tych substancji w kontekście prewencji raka okrężnicy. Dziwi to w świetle ogromnej popularności borowika zarówno w perspektywie jego występowania jak i spożycia. Prezentowana praca stanowi oryginalną i jak na to wskazują dane literaturowe pierwszą próbę zgłębienia tego tematu.

Celem pracy było określenie chemoprewencyjnych właściwości frakcji izolowanych z *Boletus edulis* względem komórek raka okrężnicy. Pierwszy etap badań miał za zadanie wyłonienie

frakcji o największym potencjale chemoprewencyjnym. Dalsze badania koncentrowały się na identyfikacji mechanizmów leżących u podstaw przeciwnowotworowych właściwości wybranej frakcji. Przedmiotem analizy były procesy kluczowe z punktu widzenia onkogenezy tj. regulacja i przebieg cyklu komórkowego, szlaki przekazywania sygnałów związane z procesami proliferacji i przeżycia komórek (MAPK, PI3/Akt oraz NFκB) oraz apoptoza.

Eksperymenty przeprowadzono na dwóch liniach komórkowych raka jelita grubego LS180 oraz HT-29. Kontrolę stanowiły komórki linii CCD 841 CoTr będące modelem prawidłowego nabłonka jelita grubego. Pierwszy etap badań tj. selekcja frakcji o największym potencjale chemoprewencyjnym, obejmował ocenę cytotoksyczności frakcji (test LDH; komórki CCD 841 CoTr) oraz analizę ich antyproliferacyjnych właściwości (testy MTT i BrdU; komórki LS180 i HT-29). Analizie poddano pięć frakcji spośród, których wyłoniono jedną frakcję oznaczoną symbolem BE3 o najlepszych parametrach chemoprewencyjnych. Dalsze badania miały za zadanie identyfikację mechanizmu odpowiedzialnego za przeciwnowotworowe właściwości frakcji BE3. W tym celu zweryfikowano zdolność frakcji do indukcji apoptozy wykorzystując technikę barwienia różnicującego (jodek propidionowy, Hoechst 33342) oraz określono aktywność kaspaz i poziom fragmentacji DNA w komórkach wystawionych na działanie BE3 przy użyciu zestawów: Cell Death Detection ELISA i Homogeneous Caspases Assay, Fluorimetric. Zdolność frakcji do modulacji przebiegu cyklu komórkowego sprawdzono za pomocą cytometrii przepływowej. Natomiast bezpośredni wpływ BE3 na ekspresję białek regulujących cykl komórkowy określono przy użyciu techniki Western Blotting. Tą samą metodą zbadano wpływ frakcji na przekazywanie sygnałów w komórce. Dodatkowo wykorzystując technikę Real Time PCR zweryfikowano zmiany w ekspresji genów o istotnym znaczeniu dla przeciwnowotworowych właściwości BE3. Ponadto, wykorzystując technikę siRNA sprawdzono wpływ wyciszania genów proapoptotycznych, których ekspresję nasilało BE3, na zdolność frakcji do indukcji programowanej śmierci w komórkach raka okrężnicy.

Wyniki badań wstępnych wykazały, że wszystkie frakcje izolowane z *Boletus edulis* w analizowanym zakresie stężeń były nietoksyczne względem komórek prawidłowych nabłonka jelita grubego. Test MTT wykazał, że wszystkie frakcje hamowały proliferację komórek raka jelita grubego, niemniej jednak bardziej specyficzne oznaczenie (test BrdU), potwierdziło zahamowanie syntezy DNA jedynie po podaniu frakcji BE3, BE4, BE5 w przypadku komórek linii LS180 oraz frakcji BE3 i BE5 w komórkach linii HT-29. Na podstawie wyników badań przesiewowych do analiz molekularnych wybrano frakcję BE3, która skutecznie hamowała proliferację komórek raka okrężnicy przy jednoczesnym braku toksyczności względem komórek prawidłowych nabłonka jelita grubego. Wyniki analiz molekularnych potwierdziły chemoprewencyjne właściwości BE3 względem komórek raka

okrężnicy linii LS180 i HT-29, ujawniając kilka mechanizmów jej przeciwnowotworowego działania. Analizowana frakcja odznaczała się zdolnością do indukcji apoptozy w komórkach raka okrężnicy, którą to właściwość powiązano z wyciszeniem szlaku PI3K/Akt/mTOR. Dodatkowo w obu liniach raka okrężnicy odnotowano jeszcze jeden mechanizm indukcji programowanej śmierci będący konsekwencją nasilenia ekspresji *BAX* oraz spadku *BCL2* po ekspozycji na BE3. Obserwowana apoptoza mitochondrialna (wewnątrzpochodna) w obu analizowanych liniach miała inne podłoże, w komórkach linii LS180 była efektem stymulacji ekspresji *TP53* i towarzyszącego jej zwiększenia poziomu p53, zaś w komórkach linii HT-29 nasilenia ekspresji *CDKN1A* i będącego jej następstwem zwiększenia poziomu p21. Zdolność frakcji BE3 do indukcji apoptozy na drodze zależnej od p53 i p21 potwierdzono rejestrując znaczny spadek ilości nukleosomów (marker apoptozy) w komórkach z wyciszoną ekspresją genów *BAX*, *TP53* i *CDKN1A* poddanych działaniu BE3.

Frakcja BE3 hamowała również proliferację komórek raka okrężnicy. Antyproliferacyjne właściwości BE3 związane były z wyciszeniem sygnałów stymulujących podziały komórek dzięki inhibicji przekazywania sygnałów w szlakach MAPK/Erk i PI3K/Akt/mTOR jak również z wyciszeniem ekspresji *MAPK3* - kluczowego komponentu szlaku MAPK/Erk kodującego kinazę Erk. Dodatkowo, podobnie jak w przypadku apoptozy, zidentyfikowano specyficzny dla każdej linii mechanizm leżący u podstaw antyproliferacyjnych właściwości BE3. W komórkach linii LS180 frakcja BE3 powodowała zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1/G0 na drodze zależnej od p16, cykliny D1, CDK4, CDK6 oraz Rb. Natomiast w przypadku komórek linii HT-29 po podaniu BE3 odnotowano ich akumulację w fazie S, co związane było z hamowaniem ekspresji cykliny D1, cykliny A oraz stymulacją ekspresji p21 i p27. Wprawdzie BE3 nie wpływało na poziom NFκB, zważywszy jednak rolę tego czynnika transkrypcyjnego, brak jego stymulacji przez frakcję BE3 świadczy na korzyść badanej substancji i zwiększa szansę na skuteczność prewencji i/lub terapii z jej udziałem.

Uzyskane wyniki wskazują na duży potencjał terapeutyczny frakcji BE3 względem nowotworów okrężnicy, niemniej jednak konieczne jest potwierdzenie skuteczności i bezpieczeństwa stosowania frakcji w badaniach na zwierzętach oraz z udziałem pacjentów. Niezbędne jest również zdefiniowanie substancji bioaktywnych obecnych we frakcji i odpowiedzialnych za jej chemoprewencyjne właściwości. Wprawdzie niektóre z zaobserwowanych aktywności BE3 można łączyć z obecnymi w niej polisacharydami ale zważywszy na ich ilość (6.1%) nie można jednoznacznie stwierdzić czy za chemoprewencyjne właściwości BE3 odpowiedzialne są wyłącznie one czy też wciąż niezidentyfikowane pozostałe składniki.

## SUMMARY

Colon cancer is one of the most common causes of cancer death in the world, including Poland. The incidence of this disease is increasing, and therefore there is still a need for seeking a new, more effective ways of treatment. Considering that process of carcinogenesis, especially tumor promotion step, takes several to tens of years, there is enough time for remedy (chemopreventive) including consumption of compounds able to inhibit or even stop the process of tumorigenesis.

Due to the possibility of long-term, safe use and proven beneficial effect on the human body, a promising and important group of substances with chemopreventive properties are products of natural origin, particularly the components of our daily diet. Among them, edible mushrooms from *Basidiomycota* deserve special attention. Number of studies have shown that they are a valuable source of biologically active compounds, including anticancer agents. Anticancer properties are mainly attributed to polysaccharides and their protein derivatives. Possibilities of their use in cancer therapy are enormous and based on their ability to stimulation of immune system as well as inhibition of tumor cell proliferation and induction of apoptosis.

So far, among the large number of *Basidiomycota*, anticancer polysaccharides and their derivatives have been isolated and fully characterized only from few species. The results of these studies led to the introduction on the market three products: lentinan, shizophyllan and krestin, which for nearly 50 years have been successfully used to treat various types of cancer. Researchers interest also raised *Boletus edulis*. Lucas et al. successfully used extract obtained from this mushrooms fruiting bodies in the treatment of cancer in mice in 1957. After nearly 20 years, Ohtsuka et al. also demonstrated anticancer properties of polysaccharide fraction isolated from *B. edulis* against Sarcoma 180 solid cancer and Ehrlich solid cancer in mice. Despite the promising results, from that time, no one attempted to isolate polysaccharides from this mushroom and characterize their biological activity. Possibility of their use for colon cancer prevention or treatment also was not investigated. It is surprising in the view of enormous popularity of this fungus, both in the terms of its occurrence and consumption. The presented study is original and as was indicated by literature data the first attempt to explore this topic.

The aim of the study was determination the chemopreventive properties of the fractions isolated from *Boletus edulis* against colon cancer cells. First step of the study was selection of faction with the greatest chemopreventive potential. Further studies focused on identification of mechanisms underlying antitumor properties of a selected fraction. The subjects of analysis were processes crucial in oncogenesis point of view such as the regulation of cell cycle

progression, signal transduction pathways associated with growth and cancer cells proliferation (MAPK and PI3/Akt NFκB) and the apoptosis.

Experiments were performed on two colon cancer cell lines LS180 and HT-29. As a control, cell line CCD 841 CoTr - model of normal colon epithelium, was used. First step of the studies namely selection the fraction with the greatest chemopreventive properties included the assessment of fractions cytotoxicity (LDH test; cells CCD 841 CoTr) and examination their antyproliferative properties (MTT and BrdU tests; cells LS180 and HT-29). Based on the obtained results one fraction (BE3) from five tested was chosen for further studies. Further studies were designed to identify the mechanism responsible for the anticancer properties of BE3 fraction. For this purpose, fraction ability to induce apoptosis was verified using a technique of differential staining (propidium iodide, Hoechst 33342). Furthermore determination of caspases activity as well as assessment of DNA fragmentation level in cells exposed to BE3 were conducted using Cell Death Detection ELISA and Homogenous Caspases Assay. Fraction ability to modulate the cell cycle progression was examined by flow cytometry. In contrast, BE3 direct impact on the expression of cell cycle regulatory proteins were determined by Western Blotting. Fraction influence on cell signaling was also studied by Western Blotting. Additionally, changes in the expression of genes important for the anticancer properties of the BE3 were verified using Real Time PCR and siRNA - mediated gene silencing technique.

Results of preliminary studies showed that all fractions isolated from *Boletus edulis* were non-toxic to normal colon epithelial cells in the whole of tested concentration range. MTT assay showed that all fractions inhibited proliferation of colon cancer cells, but a more specific test based on measurement of BrdU incorporation confirmed the inhibition of DNA synthesis only after cells treatment by BE3, BE4, BE5 in the case of LS180 cell line and BE3 and BE5 in HT-29 cell line. Based on the obtained results BE3 fraction was selected for further studies.

The molecular studies confirmed BE3 chemopreventive properties against colon cancer cells revealing some mechanisms of its anticancer activities. The tested fraction was able to induce apoptosis in colon cancer cells, which was linked with silencing of PI3K/AKT/mTOR pathway. Furthermore, additional proapoptotic mechanism was observed in both cell lines - enhancement of *BAX* expression with simultaneously decrease of *BCL2* expression. Noted mitochondrial apoptosis (intrinsic) has got different bases depending on investigated model. Intrinsic apoptosis was the result of *TP53* up regulation and following increase of p53 level in LS180 cells, on the contrary in HT-29 cells cell death was the effect of up regulation of *CDKN1A* and following increase of p21 concentration. p53 and p21 dependent induction of apoptosis by BE3 fraction was confirmed by significant decrease of nucleosomes amount

(DNA degradation products, a marker of apoptosis) in cells exposed to BE3 with silenced *BAX, TP53, CDKN1A*.

BE3 fraction was also able to inhibit proliferation of colon cancer cells. Antiproliferative properties of BE3 were associated with silencing signals that stimulate cell division by inhibition of signals transduction in MAPK/Erk and PI3K/AKT/mTOR pathways as well as silencing the expression of *MAPK3* - a key component of the MAPK/Erk pathway, coding kinase Erk. Moreover, similarly to apoptosis, one more specific mechanism of antiproliferative action for each cell line was recorded. The fraction BE3 induced cell cycle arrest in the G0/G1 phase in LS180 cells by modulation of p16/CyclinD/CDK4-6/pRb pathway. In the case of HT-29 cells BE3 caused the accumulation of cells in the S phase, which was connected with cyclin D1 and cyclin A inhibition as well as stimulation of p21 and p27 expression. Although BE3 did not influence the NFκB level, given the role of this transcription factor, the lack of stimulation by tested fraction indicates the benefit of BE3 in respect to its effective use in the prevention and/or therapy.

The obtained results indicate the high therapeutic potential of BE3 fraction against colon cancer, however it is necessary to confirm the fraction efficacy and safety in animal and clinical studies. It is also necessary to define the bioactive substances present in the fraction, which are responsible for its chemopreventive properties. Although some of the observed BE3 activities can be explained by polysaccharides presence in the fraction, given their amount (6.1%) it could not be excluded that unidentified non-sugar components of BE3 fraction are responsible for its advantageous properties.