



**Instytut Biochemii i Biofizyki  
Polskiej Akademii Nauk**

**Aktywność białek z rodziny AlkB w warunkach homeostazy i  
stanach patologicznych**

The activity of AlkB family proteins under homeostasis and  
pathological conditions

**Tomaš Pilžys**

Promotor rozprawy doktorskiej:  
Prof dr hab. Elżbieta Grzesiuk

Warszawa 2020

## Strzeszczenie

Otyłość i nowotworzenie są jednymi z najczęściej spotkanych chorób XXI wieku, często nazywanymi chorobami cywilizacyjnymi. Każdego roku coraz więcej osób zmaga się z otyłością, która ostatecznie przyczynia się do rozwoju następnych chorób, w tym chorób serca, nadciśnienia, cukrzycy czy nowotworów. Na rozwój tych chorób największy wpływ ma nieodpowiedni styl życia, dieta i środowisko, lecz także czynniki genetyczne, mutacje w określonych genach czy zmiana ekspresji poszczególnych białek, w tym dioksygenaz z rodziny AlkB.

Bakterijne białko AlkB (EcAlkB) jest dioksygenazą, zależną od Fe(II) i 2-oksoglutaranu, biorącą udział w naprawie DNA i/lub RNA. Białko usuwa szereg grup alkilowych bez ingerencji w strukturę kwasów nukleinowych. U ssaków występuje dziewięć homologów bakteryjnego białka AlkB – ALKBH1 – 8 i FTO. Dokładna rola białek ALKBH dotychczas nie jest poznana, aczkolwiek wiadomo, że białka te biorą udział w usuwaniu różnych uszkodzeń alkilacyjnych lub modyfikacji z DNA, RNA, a nawet białek. Pomimo podobnej sekwencji i struktury, dioksygenazy wykazują odrębne funkcje i specyficzność substratową. Poprzez swoją aktywność enzymatyczną białka te są zaangażowane w wiele procesów biologicznych, w tym adipogenezę i rozwój nowotworów.

Przedstawione w tej pracy wyniki dotyczą poznania i charakterystyki roli białek ALKBH w rozwoju nowotworów głowy i szyi człowieka oraz stanów patologicznych takich jak otyłość i cukrzyca na modelu świni. W skład prezentowanej rozprawy doktorskiej wchodzą trzy publikacje:

- (i) **“ALKBH overexpression in head and neck cancer: potential target for novel anticancer therapy”.** W pracy wykazano podwyższony poziom ekspresji białek ALKBH w nowotworach głowy i szyi w porównaniu z tkanką zdrową przylegającą. Dodatkowo wykryto wysoki poziom białek ALKBH w wybranych ludzkich nowotworowych liniach komórkowych. Przedstawiono nową lokalizację komórkową białek ALKBH w guzach. Wykryto, że wyciszenie ekspresji poszczególnych genów *ALKBH* obniża przeżywalność komórek nowotworowych HeLa. Dodatkowo wykazano, że poziom ALKBH3 i FTO pozytywnie koreluje z wielkością guza. Uwieńczeniem tych badań było zsynetyzowanie i przebadanie działających przeciwnowotworowo, nowych pochodnych antrachinonu, inhibitorów białek ALKBH.
- (ii) **“Intracellular and tissue specific expression of FTO protein in pig - changes with age, energy intake and metabolic status”.** Praca jest poświęcona określeniu wpływu białka FTO, dziewiętego homologa bakteryjnego białka AlkB, na rozwój otyłości i cukrzycy typu 2. Badania przeprowadzono na modelu świni, który znacznie lepiej odzwierciedla metabolizm człowieka niż najczęściej stosowane gryzonie. Określono lokalizację białka FTO na poziomie komórkowym i tkankowym. Najwyższy poziom FTO wykryto w mózdku, śliniankach, śledzionie i nerce. Mimo, że poziom FTO w trzustce był ogólnie niski, to okazało się, że poziom tego białka jest wybiórczo wysoki w wysepkach Langerhansa, a konkretnie w komórkach β odpowiedzialnych za produkcję insuliny. Przebadano również poziom ekspresji FTO w tkankach w zależności od wieku świń

(nowonarodzone *versus* dorosłe), stosowanej diety (wysoko- i niskoenergetyczna) czy statusu metabolicznego (prosięta z syndromem wewnętrzmacicznego zahamowania wzrostu IUGR). Ostatecznie zaobserwowano, że poziom ekspresji białko FTO w trzustce jest zależny od stosowanej diety.

- (iii) **“Human and *Arabidopsis* alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase homolog proteins – new players in important regulatory processes”**. Jest to praca przeglądowa przedstawiająca dotychczas zgromadzoną wiedzą na temat białek ALKBH u *Homo sapiens* i *Arabidopsis thaliana*. Największą uwagę poświęcono dwóm białkom ludzkim ALKBH5 i FTO oraz białku ALKBH10B *Arabidopsis thaliana*. Białka te są demetylazami modyfikującymi N<sup>6</sup>-metyloadenozynę w RNA. Aktywność ta ma wpływ na metabolizm organizmów wyższych np. stwierdzono, że ALKBH10B wpływa na proces kwitnienia. W przedstawionej pracy opisano też miejsca fosforylacji, jako potranslacyjnych modyfikacji białek ALKBH.

## Abstract

Obesity and cancer are one of the most common diseases of the 21<sup>st</sup> century, often called lifestyle diseases. More and more people are struggling with obesity every year, which ultimately contributes to the development of other diseases, including heart diseases, hypertension, diabetes or cancer. Inadequate lifestyle, diet, environment, but also genetic factors, like mutations in specific genes or a change in the level of expression of individual proteins, including AlkB family dioxygenases, have the most influence on the development of diseases.

The bacterial protein AlkB (EcAlkB) is a dioxygenase, dependent on Fe(II) and 2-oxoglutarate, involved in DNA and/or RNA repair. The protein removes a number of alkyl groups without interference into the nucleic acid structure. Mammals have nine homologues of the bacterial protein AlkB - ALKBH1 - 8 and FTO. The exact role of ALKBH proteins is not known yet, although it is known that these proteins are involved in the removal of various alkylation damages or modifications from DNA, RNA and even proteins. Despite similar sequence and structure, dioxygenases exhibit distinct functions and substrate specificity. Proteins are involved in many biological processes, including adipogenesis and cancer development, through their enzymatic activity.

The results presented in this thesis concern knowledge and characterization of the role ALKBH proteins in the development of human head and neck cancers as well as pathological condition such as obesity and diabetes on a pig model. The presented doctoral dissertation consists of three publications:

- (i) **“ALKBH overexpression in head and neck cancer: potential target for novel anticancer therapy”**. The study showed an increased level of ALKBH protein expression in head and neck cancer compared to normal adherent tissue. In addition, high levels of ALKBH proteins have been detected in selected cancer human cell lines. New cellular localization of ALKBH proteins in tumors has been shown. Silencing of expression of individual ALKBH genes reduce HeLa cell survival. In addition, ALKBH3 and FTO levels have been shown to correlate positively with tumor size. The culmination of these studies was the synthesis and testing of anthraquinone derivatives of anti-cancer properties, the inhibitors of ALKBH proteins.
- (ii) **“Intracellular and tissue specific expression of FTO protein in pig - changes with age, energy intake and metabolic status”**. The work dedicated to determine the effect of the FTO protein, the ninth homologue of the bacterial AlkB protein, on the development of obesity and type 2 diabetes. The study was conducted on a pig model that reflects better human metabolism than the most commonly used rodents. The localization of the FTO protein at the cellular and tissue level was determined. The highest FTO levels were found in cerebellum, salivary glands, spleen and kidney. Although the FTO level in the pancreas was low, it turned out that the level of this protein is high in the Langerhans islets, specifically in  $\beta$  cells responsible for insulin production. The level of FTO expression in tissues was also examined depending on the pig age (newborn *versus* adults), diet (high and low energy) or metabolic status (piglets

with intrauterine growth restriction IUGR). Finally, it was observed that the level of FTO protein expression in pancreas was diet-dependent.

- (iii) **"Human and *Arabidopsis* alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase homolog proteins – new players in important regulatory processes"**. This review presents so far collected knowledge about ALKBH protein in *Homo sapiens* and *Arabidopsis thaliana*. The most attention was devoted for two human proteins ALKBH5 and FTO, and ALKBH10B *Arabidopsis thaliana*. These proteins are demethylases, which remove N<sup>6</sup>-methyladenosine modification from RNA. This activity has an impact on the metabolism of higher organisms, e.g. ALKBH10B has been found to affect the flowering process. The presented review also describes phosphorylation sites as post-translational modification of the ALKBH proteins.