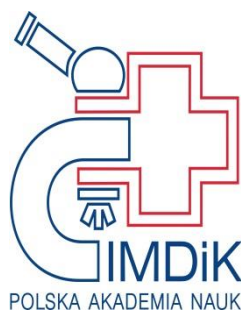


mgr inż. Ewelina Julia Majewska

**WPLYW TRANSFEKCJI SEKWENCJĄ KODUJĄCĄ  
GLUTAMINAZĘ TYPU WĄTROBOWEGO (GAB) NA ŚCIEŻKI  
SYGNAŁOWE I WŁASNOŚCI BIOLOGICZNE LINII  
KOMÓRKOWYCH GLIOBLASTOMA**

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych  
w dyscyplinie: biologii medycznej

Promotor: dr hab. Monika Paulina Szeliga



 Ministerstwo Nauki  
i Szkolnictwa Wyższego

**KNOW**

Krajowy Naukowy  
Ośrodek Wiodący  
2012-2017

 **NARODOWE  
CENTRUM  
NAUKI**

Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową  
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

WARSZAWA 2018

Wyniki zamieszczone w niniejszej rozprawie zostały częściowo opublikowane w pracy:

**Majewska E**, Rola R, Barczewska M, Márquez J, Albrecht J, Szeliga M. Transcription factor GATA3 expression is induced by GLS2 overexpression in a glioblastoma cell line but is GLS2-independent in patient-derived glioblastoma. *J Physiol Pharmacol.* 2017 Apr;68(2):209-214.

Badania, których wyniki przedstawiono w niniejszej pracy były częściowo finansowane przez:

1. Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący (KNOW-IMDiK PAN) w ramach projektu KNOW01
2. Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu PRELUDIUM (2016/23/N/NZ5/01428)

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania Pani dr hab. Monice Szelidze, która obdarzyła mnie ogromnym zaufaniem i wprowadziła w zupełnie nową dla mnie dziedzinę nauki, przekazywała mi wiedzę i cenne wskazówki podczas niezliczonych godzin konsultacji oraz nieustannie inspirowała na każdym etapie powstawania niniejszej pracy.*

*W tym miejscu chcę też wyrazić wdzięczność Panu prof. dr hab. Janowi Albrechtowi, bez którego moja praca doktorska nie mogłaby powstać. Dziękuję za pomoc w jasnym formułowaniu myśli naukowej oraz motywację do opracowania samodzielnych koncepcji na tle istniejącej literatury naukowej.*

*Chciałabym również podziękować pozostałym członkom zespołu stanowiącego Zakład Neurotoksykologii. Dziękuję:*

*Dr hab. Magdalenie Zielińskiej za cenne rady i pomoc merytoryczną,*

*Dr Wojciechowi Hilgierowi za profesjonalne podejście do techniki HPLC,*

*Dr Marcie Obarze-Michlewskiej za owocne dyskusje i rady metodologiczne,*

*Dr Krzysztofowi Milewskiemu za gotowość do pomocy,*

*Dr Annie Czarneckiej za słowa wsparcia,*

*Małgorzacie Bogacińskiej-Karaś za wspólnie spędzone długie godziny w świecie hodowli komórkowych,*

*Inez Fręsko za dodawanie otuchy w trudnych chwilach oraz pogodę ducha,*

*Dorocie Rycko za życzliwość,*

*Doktorantom (Mariuszowi Popkowi, Kasi Skowrońskiej, Kasi Dąbrowskiej, Karolinie Orzeł, Markowi Pawlikowi) za wspólnie pokonaną drogę i niesamowitą atmosferę przez wszystkie lata.*

*Za niezłomną wiarę we mnie okazywaną każdego dnia dziękuję przyjaciółom i rodzinie.*

*Szczególne słowa podziękowania składam mojej siostrze Iwonie, która dzielnie wysłuchiwała wszystkich moich naukowych rozważań, może ich nie rozumiejąc, ale dając mi niepowtarzalną możliwość uporządkowania natłoku myśli.*

*Ewelina*

# SPIS TREŚCI

<b>SPIS TREŚCI.....</b>	<b>4</b>
<b>I. WYKAZ SKRÓTÓW .....</b>	<b>7</b>
<b>II. WSTĘP .....</b>	<b>12</b>
<b>II.1. Glioblastoma .....</b>	<b>12</b>
<b>II.2. Glutamina i glutaminian w ośrodkowym układzie nerwowym.....</b>	<b>16</b>
<b>II.3. Glutamina i glutaminian w glioblastoma .....</b>	<b>19</b>
<b>II.4. Glutaminaza .....</b>	<b>19</b>
II.4.1 Glutaminaza typu nerkowego .....	20
II.4.2 Glutaminaza typu wątrobowego .....	22
<b>II.5. Rola glutaminazy w nowotworach.....</b>	<b>25</b>
<b>II.6. Elementy szlaku WNT .....</b>	<b>28</b>
II.6.1 Białko GATA3.....	28
II.6.2 Kinaza AKT.....	29
<b>III. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY .....</b>	<b>31</b>
<b>IV. MATERIAŁY I METODY .....</b>	<b>33</b>
<b>IV.1. Linie komórkowe ludzkiego glioblastoma .....</b>	<b>33</b>
<b>IV.2. Transfekcja komórek glioblastoma .....</b>	<b>35</b>
<b>IV.3. Materiał biopsyjny.....</b>	<b>36</b>
<b>IV.4. Izolacja RNA .....</b>	<b>37</b>
<b>IV.5. Reakcja odwrotnej transkrypcji.....</b>	<b>38</b>
<b>IV.6. Reakcja łańcuchowa polimerazy .....</b>	<b>39</b>
<b>IV.7. Elektroforeza w żelu agarozowym.....</b>	<b>41</b>
<b>IV.8. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym .....</b>	<b>41</b>
<b>IV.9. Test MTT .....</b>	<b>43</b>
<b>IV.10. Test proliferacji.....</b>	<b>44</b>
<b>IV.11. Test formowania kolonii.....</b>	<b>44</b>

<b>IV.12. Test migracji.....</b>	<b>45</b>
<b>IV.13. Oznaczanie zawartości glutaminy i glutaminianu wewnątrzkomórkowego metodą HPLC .....</b>	<b>45</b>
<b>IV.14. Oznaczanie białka .....</b>	<b>46</b>
IV.14.1. Metoda Bradford .....	46
IV.14.2. Metoda BCA .....	47
<b>IV.15. Izolacja białek i Western blot .....</b>	<b>47</b>
<b>IV.16. Analiza statystyczna wyników .....</b>	<b>51</b>
<b>V. WYNIKI .....</b>	<b>52</b>
<b>V.1. Ekspresja genu <i>GLS2</i> i poziom kodowanego przez niego białka w wybranych komórkach linii glioblastoma .....</b>	<b>52</b>
<b>V.2. Wpływ transfekcji sekwencją kodującą GAB na własności biologiczne wybranych linii ludzkiego glioblastoma .....</b>	<b>53</b>
V.2.1. Przeżywalność komórek .....	54
V.2.2. Proliferacja komórek .....	54
V.2.3. Formowanie kolonii.....	55
V.2.4. Migracja komórek.....	57
<b>V.3. Wpływ transfekcji sekwencją kodującą GAB na wewnątrzkomórkowy poziom glutaminy i glutaminianu w komórkach linii glioblastoma .....</b>	<b>59</b>
<b>V.4. Wpływ transfekcji sekwencją kodującą GAB na ekspresję genu i poziom białka GATA3 w liniach komórkowych T98G i U87MG oraz ekspresję genu i poziom białka GATA3 w GBM i tkankach kontrolnych .....</b>	<b>60</b>
<b>V.5. Wpływ transfekcji sekwencją kodującą GAB na poziom wybranych białek należących do szlaku AKT w komórkach linii glioblastoma .....</b>	<b>63</b>
<b>V.6. Wpływ transfekcji sekwencją kodującą GAB na wrażliwość komórek wybranych linii glioblastoma ludzkiego na działanie nadtlenu wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).....</b>	<b>65</b>
<b>V.7. Wpływ transfekcji sekwencją kodującą GAB na wybrane elementy szlaku sygnałowego AKT w komórkach linii glioblastoma ludzkiego traktowanych nadtleniem wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) .....</b>	<b>67</b>
V.7.1. Poziom wybranych białek szlaku sygnałowego AKT w komórkach traktowanych H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	67
V.7.2. Aktywność kaspaz 3/7 w warunkach stosowania H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	70
V.7.3. Rola obniżonej aktywności szlaku AKT w uwrażliwieniu komórek linii glioblastoma transfekowanych sekwencją GAB na działanie H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	71
<b>VI. DYSKUSJA.....</b>	<b>73</b>
<b>VI.1. Wpływ GAB na własności biologiczne komórek glioblastoma .....</b>	<b>73</b>
<b>VI.2. Poziom glutaminy i glutaminianu w komórkach po transfekcji GAB .....</b>	<b>74</b>
<b>VI.3. Poziom GAB i GATA3 w komórkach glioblastoma.....</b>	<b>76</b>
<b>VI.4. Wpływ GAB na modulowanie szlaku AKT .....</b>	<b>77</b>

<b>VI.5. Wpływ GAB na wrażliwość komórek na stres oksydacyjny – rola szlaku AKT .....</b>	<b>78</b>
<b>VII. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI .....</b>	<b>82</b>
<b>VIII. INNOWACYJNOŚĆ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ .....</b>	<b>84</b>
<b>IX. STRESZCZENIE .....</b>	<b>85</b>
<b>X. ABSTRACT.....</b>	<b>90</b>
<b>XI. LITERATURA .....</b>	<b>94</b>

**I. WYKAZ SKRÓTÓW**

ACT $\beta$	$\beta$ -aktyna
AKT	kinaza białkowa B (ang. <i>protein kinase B</i> )
ANOVA	analiza wariancji (ang. <i>analysis of variance</i> )
ATCC	bank hodowli komórkowych (ang. <i>American Type Culture Collection</i> )
ATO	tlenek arsenu (III) (ang. <i>arsenic trioxide</i> )
BCA	kwas bis-cynchoninowy (ang. <i>bicinchoninic acid</i> )
BrdU	5-bromo-2'-deoksyurydyna
BSA	albumina surowicy bydłej (ang. <i>bovine serum albumin</i> )
cDNA	komplementarny DNA (ang. <i>complementary DNA</i> )
CSF	płyn mózgowo-rdzeniowy (ang. <i>cerebrospinal fluid</i> )
DEPC	dwuetylopirowęglan (ang. <i>diethylpyrocarbonate</i> )
DMEM	pożywka do hodowli komórkowych (ang. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> )
DMSO	metylosulfinylometan (ang. <i>dimethyl sulfoxide</i> )
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	trójfosforan deoksyrybonukleozydu (ang. <i>deoxyribonucleoside triphosphate</i> )
EATC	mysia linia komórkowa wyprowadzona z gruczolaka Ehrlicha (ang. <i>Ehrlich ascites tumour cells</i> )
EDTA	kwas wersenowy; kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EGTA	kwas etylenoglikol-O-O'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N'tetraoctowy
EGFR	receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (ang. <i>epidermal growth factor receptor</i> )
EMEM	pożywka do hodowli komórkowych (ang. <i>Eagle's Minimum Essential Medium</i> )
FBS	płodowa surowica bydłca (ang. <i>fetal bovine serum</i> )

---

G418	genetycyna
GA	glutaminaza aktywowana fosforanem (ang. <i>phosphate activated glutaminase</i> )
GAB	dłuższa izoforma glutaminazy typu wątrobowego
GABA	kwasy $\gamma$ -aminomasłowy
GAC	krótsza izoforma glutaminazy typu nerkowego
GAPDH	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (ang. <i>glyceraldehyde 3-phospho dehydrogenase</i> )
GATA3	czynnik transkrypcyjny z rodziny GATA (ang. <i>GATA Binding Protein 3</i> )
GBM	glejak wielopostaciowy (ang. <i>glioblastoma</i> )
GIP	białko oddziałujące z glutaminazą (ang. <i>Glutaminase Interacting Protein</i> )
Gln	glutamina
GLS	gen kodujący glutaminazę typu nerkowego
GLS2	gen kodujący glutaminazę typu wątrobowego
Glu	glutaminian
GS	syntetaza glutaminy (ang. <i>glutamine synthetase</i> )
GSH	glutation
GSK3 $\beta$	kinaza syntazy glikogenowej 3 $\beta$ (ang. <i>glycogen synthase kinase 3 beta</i> )
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	nadtlenek wodoru
HPLC	wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa (ang. <i>high pressure liquid chromatography</i> )
IDH	gen kodujący dehydrogenazę izocytrynianową (ang. <i>isocitrate dehydrogenase I</i> )
I $\kappa$ $\beta$	inhibitor jądrowego czynnika transkrypcyjnego $\kappa$ $\beta$
KGA	dłuższa izoforma glutaminazy typu nerkowego
K <sub>m</sub>	stała Michaelisa
LGA	krótsza izoforma glutaminazy typu wątrobowego
LGDLL	sekwencja aminokwasowa leucyna-glicyna-asparaginian-leucyna-leucyna
LN229	linia komórkowa wyprowadzona z GBM



LNGAB	komórki linii LN229 transfekowane wektorem niosącym pełną sekwencję cDNA ludzkiej GAB
LNpcDNA	komórki linii LN229 transfekowane pustym wektorem pcDNA
MEME	pożywka do hodowli komórkowych (ang. <i>Minimal Essential Medium Eagle</i> )
MGMT	metylotransferaza DNA O <sup>6</sup> metyloguaniny (ang. <i>O<sup>6</sup>-alkylguanine DNA alkyltransferase</i> )
miRNA	microRNA
mRNA	matrycowy RNA (ang. <i>messenger RNA</i> )
mTORC2	kompleks 2 kinazy mTOR składający się z kinazy mTOR oraz białek Rictor, mLST8/GbL i mSin1
MTT	bromek 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ylo)-2,5-difenylotetrazolu (ang. <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium</i> )
NF- $\kappa$ B	jądrowy czynnik transkrypcyjny (ang. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> )
OD	gęstość optyczna (ang. <i>optical density</i> )
OPA	aldehyd ortoftalowy
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PBS	roztwór soli buforowany fosforanami (ang. <i>phosphate buffered saline</i> )
pcDNA	pusty wektor pcDNA3
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>polymerase chain reaction</i> )
PDGF	płytkowopochodny czynnik wzrostu (ang. <i>platelet-derived growth factor</i> )
PDK1	kinaza 1 zależna od fosfatydyloinozytolu (ang. <i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1</i> )
PDZ	domena białkowa (ang. <i>PSD-95/Disc large/ZO-1 domain</i> )
PFA	paraformaldehyd
pGAB	wektor pcDNA3 zawierający sekwencję kodującą GAB
PI3K	kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (ang. <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i> )

---

PIP2	fosfatydyloinozytolo-4,5-bifosforan (ang. <i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i> )
PIP3	fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforan (ang. <i>phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate</i> )
PTEN	fosfataza (ang. <i>phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase</i> )
Pz	pary zasad
RIPA	bufor lizujący do WB (ang. <i>radio-immunoprecipitation assay</i> )
RNA	kwas rybonukleinowy
RNaza	rybonukleaza
RT	temperatura pokojowa (ang. <i>room temperature</i> )
RTK	receptor o aktywności kinazy tyrozynowej
RT-PCR	PCR w czasie rzeczywistym (ang. <i>real-time PCR</i> )
SD	odchylenie standardowe (ang. <i>standard deviation</i> )
SDS	dodecylosiarczan sodu (ang. <i>sodium dodecyl sulphate</i> )
SDS-PAGE	elektroforeza na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących
SNT	$\alpha$ -1-syntropina (ang. <i><math>\alpha</math>-1-syntrophin</i> )
T98G	linia komórkowa wyprowadzona z GBM
TGAB	komórki linii T98G transfekowane wektorem niosącym pełną sekwencję cDNA ludzkiej GAB
TMZ	temozolomid
TpcDNA	komórki linii T98G transfekowane pustym wektorem pcDNA
TBE	bufor do elektroforezy DNA, tris-boran-EDTA (ang. <i>tris-borate-EDTA</i> )
TBS-T	roztwór soli buforowany Trisem, z dodatkiem Tween-20 (ang. <i>tris-buffered saline with Tween-20</i> )
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
TNF- $\alpha$	czynnik martwicy nowotworu (ang. <i>tumor necrosis factor</i> )
TP53	supresor nowotworowy TP53
U87MG	linia komórkowa wyprowadzona z GBM

UGAB	komórki linii U87MG transfekowane wektorem niosącym pełną sekwencję cDNA ludzkiej GAB
UpcDNA	komórki linii U87MG transfekowane pustym wektorem pcDNA
WB	Western blot
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organization</i> )

## II. WSTĘP

### II.1. Glioblastoma

Glejaki są nowotworami wywodzącymi się z komórek glejowych (astrocytów, oligodendrocytów i ependymocytów) i stanowią ponad 80% wszystkich złośliwych guzów mózgu (Ostrom i wsp., 2015; Ostrom i wsp., 2014). Zaproponowana przez Światową Organizację Zdrowia (World Health Organization, WHO) klasyfikacja dzieli te nowotwory ze względu na ich stopień złośliwości od I do IV (WHO grade I-IV), który przypisuje się na podstawie analizy cech histologicznych guza, takich jak: atypia jądrowa, nekroza, aktywność mitotyczna, indeks proliferacji czy anaplazja (Ahmed i wsp., 2014; Louis i wsp., 2007).

Glejak wielopostaciowy (ang. *glioblastoma*, GBM) jest najczęstszym i najbardziej agresywnym glejakiem pochodzenia astrocytarnego o IV stopniu złośliwości według klasyfikacji WHO. GBM stanowi 45,2% przypadków wszystkich pierwotnych nowotworów złośliwych ośrodkowego układu nerwowego (OUN) i 54% wszystkich glejaków (Thakkar i wsp., 2014). Roczna zapadalność na GBM w Stanach Zjednoczonych została oszacowana na około 3 przypadki na 100 tys. osób (Thakkar i wsp., 2014). Widoczna jest różnica w zachorowalności na GBM w zależności od płci, przy czym większą częstość występowania GBM stwierdzono u mężczyzn (około 1,6 razy wyższa) w porównaniu do kobiet (Thakkar i wsp., 2014). Odnotowano także różnice w częstości występowania GBM pomiędzy mieszkańcami krajów wysoko-, średnio- i niskorozwiniętych. W krajach bogatych prawdopodobieństwo zachorowania utrzymuje się na poziomie 5,8 na 100 000 mężczyzn i 4,4 na 100 000 kobiet, podczas gdy w krajach słabo rozwiniętych stosunek ten obniża się do 3,2 na 100 000 mężczyzn i 2,8 na 100 000 kobiet (Ahmed i wsp., 2014). Należy jednak zwrócić uwagę, że mniejsza liczba stwierdzonych przypadków w krajach słabo rozwiniętych może być odzwierciedleniem gorszej dostępności opieki medycznej w tych krajach oraz mniejszej skuteczności diagnozowania chorych.

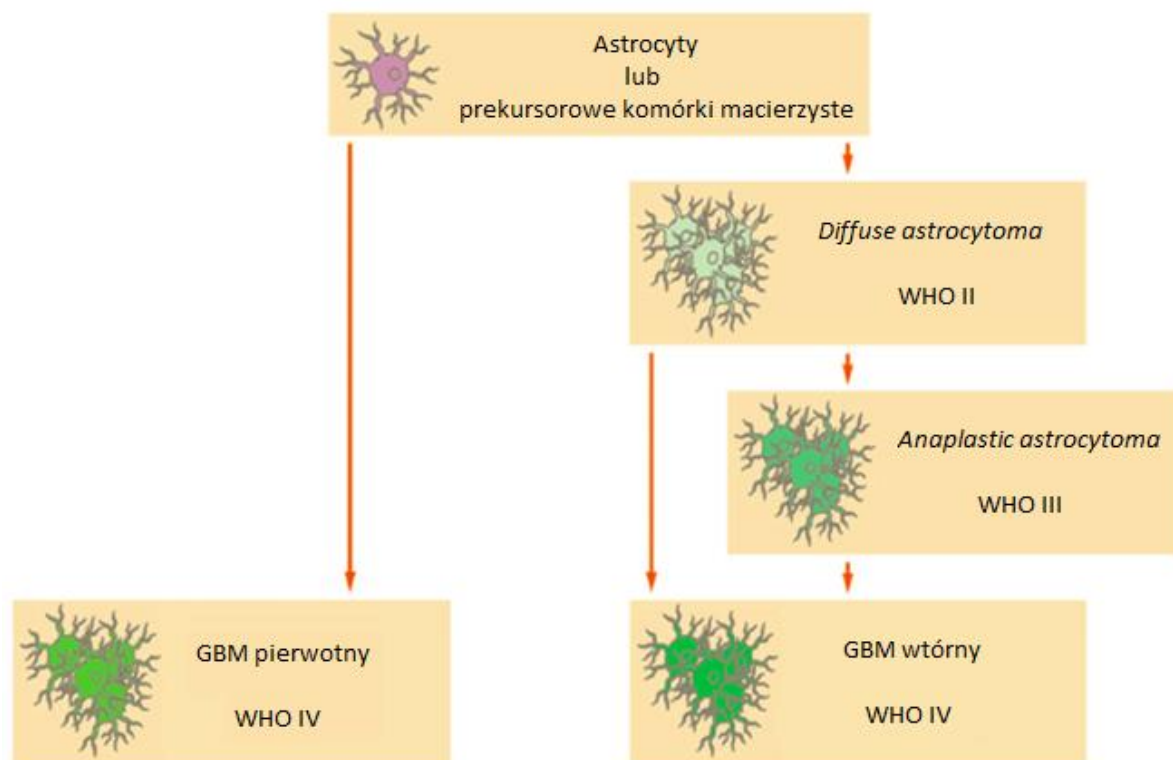
Dane epidemiologiczne wskazują na szereg czynników potencjalnie odpowiedzialnych za powstawanie GBM. Do rozważanych czynników ryzyka należą: nieodpowiednia dieta, zanieczyszczenie środowiska, nadużywanie leków oraz substancji uzależniających (papierosy, alkohol, narkotyki), urazy mechaniczne głowy, pole

elektromagnetyczne, promieniowanie jonizujące lub niejonizujące, a także podłoże genetyczne (Wrensch i wsp., 2002). Jako potencjalny czynnik ryzyka brany był także pod uwagę wpływ używania telefonów komórkowych, jednak wyniki prowadzonych badań nie potwierdziły istnienia takiej zależności (Wrensch i wsp., 2002), jedynie dane pochodzące z przeprowadzonej metaanalizy wykazały, że po 10 latach używania telefonu komórkowego może wzrastać ryzyko zachorowania na GBM (Hardell i wsp., 2007). Podsumowując, pomimo ogromnego postępu nauki i medycyny dotąd nie udało się jednoznacznie określić etiologii GBM.

Dotychczas postawiono dwie hipotezy dotyczące powstawania glejaków. Pierwsza postuluje, że glejak wykształca się na skutek transformacji nowotworowej neuronalnych komórek macierzystych lub progenitorowych komórek glejowych. Mutacje w DNA aktywują migrację tych komórek do innych rejonów mózgu, gdzie na drodze dalszych genetycznych mutacji ulegają pełnej transformacji nowotworowej. Druga zakłada, że glejak powstaje z dojrzałych astrocytów lub oligodendrocytów, które w wyniku mutacji ulegają odróżnicowaniu odzyskując pełne zdolności do proliferacji i migracji, podobne do tych posiadanych przez komórki progenitorowe we wczesnym rozwoju OUN (Maher i wsp., 2001).

W 2016 roku WHO podzieliła GBM ze względu na status *IDH*, genu kodującego dehydrogenazę izocytrynianową (ang. *isocitrate dehydrogenase I*) na GBM z *IDH* typu dzikiego (ang. *IDH-wild type*) oraz GBM ze zmutowanym *IDH* (ang. *IDH-mutant*), które najczęściej odpowiadają odpowiednio GBM pierwotnym i wtórnym (Louis i wsp., 2016). Podział GBM na pierwotne i wtórne odnosi się do procesu progresji nowotworu (Ryc. II.1.) (Ohgaki i Kleihues, 2007), w którym postać pierwotna GBM powstaje najprawdopodobniej ze zdrowych komórek *de novo*, podczas gdy wtórna rozwija się z glejaka o niższym stopniu złośliwości (Kleihues i Ohgaki, 2000). GBM pierwotny stanowi 90-95% przypadków GBM. Rozwija się bardzo szybko u pacjentów w starszym wieku (średni wiek 62 lata), bez klinicznych lub histologicznych dowodów na istniejącą mniej złośliwą zmianę prekursorową. Ponad 60% pacjentów z pierwotnym GBM ma historię choroby krótszą niż 3 miesiące (Ohgaki i Kleihues, 2009; Ohgaki i wsp., 2004). Wtórne glejaki są rzadsze (mniej niż 10% przypadków) i dotyczą młodszych pacjentów (średni wiek 45 lat). Rozwijają się wolniej poprzez progresję z guzów pochodzenia astrocytarnego o niższych stopniach złośliwości: gwiazdziaka rozlanego (ang. *diffuse astrocytoma*, WHO II) lub gwiazdziaka anaplastycznego (ang. *anaplastic astrocytoma*,

WHO III) (Ohgaki i Kleihues, 2009; Ohgaki i wsp., 2004). Wyższą częstość zachorowalności na GBM pierwotnego obserwuje się u mężczyzn (stosunek odnotowanych przypadków mężczyzn do kobiet; 1,33), natomiast GBM wtórnego u kobiet (stosunek odnotowanych przypadków mężczyzn do kobiet; 0,65) (Thakkar i wsp., 2014; Ohgaki i wsp., 2004).



**Ryc. II.1. Schemat powstawania GBM pierwotnych i wtórnych.** Na podstawie Ohgaki i Kleihues, 2007, zmodyfikowane.

Pomimo postępu medycyny, GBM jest chorobą nieuleczalną o bardzo złym rokowaniu: czas przeżycia od momentu rozpoznania wynosi 12-15 miesięcy (mediana czasu przeżycia 14,6 miesiąca), a średnia przeżywalność wynosi zaledwie 3,3% po 2 latach i 1,2% po 3 latach (Alifieris i Trafalis, 2015). Tak złe rokowanie wynika głównie z intensywnej proliferacji komórek GBM oraz ze zdolności komórek do naciekania (infiltracji) zdrowych tkanek. Leczenie GBM jest złożone i obejmuje: i). maksymalnie bezpieczną resekcję guza; ii). radioterapię z równoczesną chemioterapią (Stupp i wsp., 2005). Najlepiej przebadanym chemioterapeutykiem jest temozolomid (TMZ), związek alkilujący DNA. Wielu pacjentów z GBM jest opornych na leczenie tym chemioterapeutykiem, co najczęściej wynika z aktywności metylotransferazy metyloguaninowej (ang. *O<sup>6</sup>-alkylguanine DNA alkyltransferase*, MGMT),

odpowiedzialnej za naprawę DNA po alkilacji w pozycji O<sup>6</sup>-guaniny (Fan i wsp., 2013). Metylacja *MGMT* blokująca ekspresję tego genu jest korzystnym czynnikiem prognostycznym i występuje w 30-60% przypadków GBM (Fan i wsp., 2013). Testowane są schematy leczenia łączące TMZ z innymi chemioterapeutykami (np. cisplatyna, bevacizumab, irinotekan, interferon), jednak najnowsze badania kliniczne nie potwierdziły przewagi tych terapii wielolekowych nad monoterapią wykorzystującą TMZ (Weller i wsp., 2013). Pomimo stosowanych terapii, wskaźnik nawrotów wynosi prawie 100% (Lara-Velazquez i wsp., 2017). Zjawisko naciekania sprawia, że trudno odnaleźć granicę między zdrową a chorą tkanką, co znacznie utrudnia, a często wręcz uniemożliwia dokładną i skuteczną resekcję guza (Alifieris i Trafalis, 2015). Nieusunięte podczas resekcji komórki nowotworowe w jamie pooperacyjnej mogą tworzyć nową masę guza w odległości 2-3 cm od granicy pierwotnej zmiany (Gaspar i wsp., 1992). Dodatkowo, stosowane obecnie chemioterapeutyki wywołują szereg działań ubocznych obniżając znacząco jakość życia pacjentów (Alifieris i Trafalis, 2015).

GBM są guzami bardzo heterogennymi pod względem molekularnym (Alifieris i Trafalis, 2015). Dotychczas zidentyfikowano w GBM szereg mutacji punktowych, aberracji chromosomowych, zmian w poziomie metylacji promotorów genów i ekspresji genów (Tab. II.1.) Wysoka heterogenność GBM obserwowana jest zarówno pomiędzy poszczególnymi guzami, jak również pomiędzy poszczególnymi komórkami w obrębie danego guza (Inda i wsp., 2014).

**Tab. II.1. Zaburzenia molekularne w GBM pierwotnym i wtórnym.**

		GBM pierwotny ( <i>IDH</i> typu dzikiego)	GBM wtórny ( <i>IDH</i> zmutowany)	Ref.
Mutacje punktowe	<i>TP53</i>	28%	65%	1,2
	<i>PTEN</i>	25%	4%	1,2
	<i>ATRX</i>	10%	-	3
	<i>TERT</i>	58%	28%	4
Amplifikacja	<i>EGFR</i>	36%	8%	1,2
	<i>PDGFRA</i>	15%	?	5
	<i>MET</i>	5%	?	5
Delecja	<i>p16<sup>INK4a</sup></i>	31%	19%	1,2
Utrata heterozygotyczności (ang. <i>loss of heterozygosity</i> , LOH)	1p	12%	15%	2
	10p	47%	8%	1,2
	10q	70%, 47%	63%, 54%	2
	13q	12%	38%	2
	19q	6%	54%	2
	22q	41%	82%	2
Metylacja	<i>p14<sup>ARF</sup></i>	6%	31%	2
	<i>p16<sup>INK4a</sup></i>	3%	19%	2
	<i>RB1</i>	14%	43%	2
	<i>MGMT</i>	36%	75%	2
	<i>TIMP-3</i>	28%	71%	2

1. Ohgaki i wsp., 2004
2. Ohgaki i Kleihues, 2007
3. Li i wsp., 2015
4. Nonoguchi i wsp., 2013
5. Szerlip i wsp., 2012

## II.2. Glutamina i glutaminian w ośrodkowym układzie nerwowym

Glutamina (Gln) jest jednym z 21 aminokwasów niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Gln jest szeroko rozpowszechniona w tkankach organizmu, a jej stężenie w zależności od tkanki wynosi od 0,7 mM do 20 mM (Souba, 1993). W płynie mózgowo-rdzeniowym (ang. *cerebrospinal fluid*, CSF) i w przestrzeniach



zewnątrzkomórkowych mózgu Gln znacznie przewyższa poziom pozostałych aminokwasów. Stężenie Gln w CSF oscyluje wokół wartości 0,5 mM (Xu i wsp., 1998; Reichel i wsp., 1995; Hamberger i Nyström, 1984), podczas gdy w płynie zewnątrzkomórkowym mierzonym w różnych obszarach mózgu stężenie Gln wynosi od 0,2 – 0,5 mM (Kanamori i Ross, 2004; Hamberger i Nyström, 1984). Największe zużycie tego aminokwasu następuje w nerkach, jelicie cienkim, wątrobie, komórkach  $\beta$ -trzustki, komórkach układu odpornościowego (limfocytach, makrofagach i neutrofilach) oraz w OUN (Newsholme i wsp., 2003).

Podstawową rolą Gln jest udział w syntezie peptydów i białek. Gln stanowi także prekursor glutaminianu (Glu) oraz pośrednio glutationu (GSH). GSH, endogeny tripeptyd, bierze udział w utrzymaniu prawidłowego potencjału redoks komórek, co ma znaczenie w regulacji wewnątrzkomórkowego metabolizmu, w procesach wzrostu i różnicowania się komórek i apoptozie. Ponadto, GSH stanowi jeden z najistotniejszych przeciwutleniaczy w komórkach (Vilhardt i wsp., 2017; Aquilano i wsp., 2014).

Występująca w dużych ilościach w OUN Gln uczestniczy w wielu szlakach metabolicznych. Istotną funkcją Gln jest udział w metabolizmie amoniaku oraz synteza neuroprzekaźników aminokwasowych: pobudzających - Glu i asparaginianu (Asp) oraz hamującego - kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA) (Albrecht i wsp., 2010a). Zachowanie odpowiedniej równowagi pomiędzy ilością Gln i Glu jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania OUN. Gln uwalniana przez astrocyty transportowana jest do neuronów glutaminianergicznych, gdzie przy udziale glutaminazy (GA) ulega hydrolizie do Glu. Glu stanowi prekursor GABA, który powstaje w wyniku jego dekarboksylacji (Schousboe, 2018; Sonnewald i wsp., 1993). Glu uwalniany jako neuroprzekaźnik do przestrzeni synaptycznej, jest wychwytywany zwrotnie przez astrocyty. W astrocytach dochodzi do syntezy Gln z Glu i amoniaku, co umożliwia detoksykację mózgu z amoniaku (Albrecht i wsp., 2010b). Reakcja ta katalizowana jest przez syntetazę glutaminy (GS), która występuje wyłącznie w astrocytach i wymaga obecności ATP (Norenberg i Martinez-Hernandez, 1979; Martinez-Hernandez i wsp., 1977).

Transport Gln pomiędzy astrocytami i neuronami odbywa się za pośrednictwem odpowiednich transporterów błonowych. Za transport Gln na zewnątrz astrocytów odpowiadają układy: N, ASC, L. Natomiast Gln dostarczana jest do neuronów za pośrednictwem transporterów należących do układu A (Bröer i Brookes, 2001).

Coraz więcej danych sugeruje, że Gln może modulować ekspresję genów i białek, aktywność białek i zmiany w wewnątrzkomórkowych stężeniach metabolitów w różnych tkankach lub komórkach. Dotychczas, wykorzystując różne modele doświadczalne, stwierdzono bezpośredni lub pośredni wpływ Gln na molekuly zaangażowane w liczne procesy zestawione w Tab. II.2. (Curi i wsp., 2007):

**Tab. II.2. Funkcje komórkowe regulowane przez Gln i odpowiadające im zmiany w poziomie ekspresji genów i aktywności białek (molekuly docelowe).**

Nazwa procesu		Molekuly na które wpływa Gln
Metabolizm komórek	Glukogeneza	PEPCK (ang. <i>phosphoenolpyruvate carboxykinase</i> )
	Cykl ornitynowy	ASS (ang. <i>argininosuccinate synthase</i> )
	Lipogeneza	FAS (ang. <i>fatty acid synthase</i> ); GPDH (ang. <i>glycerophosphate dehydrogenase</i> )
Proliferacja komórek		ERK (ang. <i>extracellular signal-regulated kinases</i> ) JNK (ang. <i>Jun N-terminal kinases</i> ) ADSS-1 (ang. <i>adenylosuccinate synthase</i> )
Szlaki anaboliczne		ASCT2 ACC (ang. <i>acetyl-CoA carboxylase</i> ) GS (ang. <i>glycogen synthase</i> )
Degradacja białek		ubikwityna (ang. <i>ubiquitin</i> )
Ochrona i naprawa komórek	Szok cieplny	białka szoku cieplnego (ang. <i>heat shock proteins</i> , HSP)
	Potencjał redoks	GSH
	Apoptoza	TRAIL (ang. <i>tumor necrosis factor related - apoptosis inducing – ligand</i> ) Fas
Funkcje immunologiczne i produkcja cytokin		CD25; CD45RO; CD71; TNF $\alpha$ (ang. <i>tumor necrosis factor</i> ) IL-1; IL-2; IL-6
Modulacja poziomu insuliny		GFAT
Formowanie macierzy zewnątrzkomórkowej		kolagen (ang. <i>collagen</i> )
Transkrypcja genów		białka szoku cieplnego (ang. <i>heat shock proteins</i> , HSP)

### II.3. Glutamina i glutaminian w glioblastoma

Gln jest aminokwasem najintensywniej zużywanym przez komórki nowotworowe. Podobnie jak w guzach o innej histogenezie, także w GBM stanowi ona główny metabolit energetyczny dla mitochondriów oraz źródło azotu do syntezy nukleotydów (Martin i wsp., 1998). Ponadto, Gln bierze udział w regulacji objętości komórek GBM, a zmiany objętości komórek mogą m.in. prowadzić do zmian w metabolizmie, zaburzać przekaźnictwo szlaków sygnałowych, powodować uszkodzenia DNA oraz wpływać na proces migracji (Ernest i Sontheimer, 2007). Ponadto, jak zaznaczono w poprzedzającym rozdziale, Gln stanowi prekursor Glu, który gromadząc się w dużych ilościach w przestrzeniach międzykomórkowych działa neurotoksycznie na prawidłowe komórki otaczające guz (Souba, 1993). Nadmierne uwalnianie Glu następuje w wyniku zaburzenia transportu tego aminokwasu. W GBM wykazano nadekspresję genu kodującego transporter ASCT2 (Dolińska i wsp., 2003; Sidoryk i wsp. 2004) przy jednocześnie obniżonej ekspresji głównego astrocytarnego transportera Glu EAAT2 (de Groot i wsp., 2005). Innym istotnym elementem odpowiedzialnym za uwalnianie dużych ilości Glu jest nadekspresja podjednostki xCT antyportera cystynowo-glutaminianowego  $x_c^-$ , który transportując do komórki cystynę przenosi na zewnątrz komórki Glu (Ye i wsp., 1999). Konsekwencją powstawania wysokiego stężenia Glu w przestrzeniach międzykomórkowych jest intensywny wzrost i migracja komórek guza (Polewski i wsp., 2016; Sontheimer, 2008; Ye i Sontheimer, 1999). Wewnątrzkomórkowy Glu wraz z cystyną stanowią prekursory do syntezy GSH. GSH jest istotnym przeciwutleniaczem, moduluje odpowiedź immunologiczną, a ponadto odpowiada za sygnalizację redoks oraz detoksykację. W różnych nowotworach, w tym GBM, obserwuje się zwiększenie poziomu GSH, co skutkuje opornością tych guzów na radio- i chemioterapię (Rocha i wsp., 2016; Kohsaka i wsp., 2013).

### II.4. Glutaminaza

Istotna rola jaką pełni Gln i Glu zarówno w prawidłowym funkcjonowaniu OUN, jak i w biologii nowotworów, spowodowała wzmożony wzrost zainteresowania glutaminazą (GA, EC 3.5.1.2). GA jest enzymem z grupy hydrolaz, który w obecności jonów fosforanowych, katalizuje reakcję hydrolizy Gln do Glu i jonów amonowych.

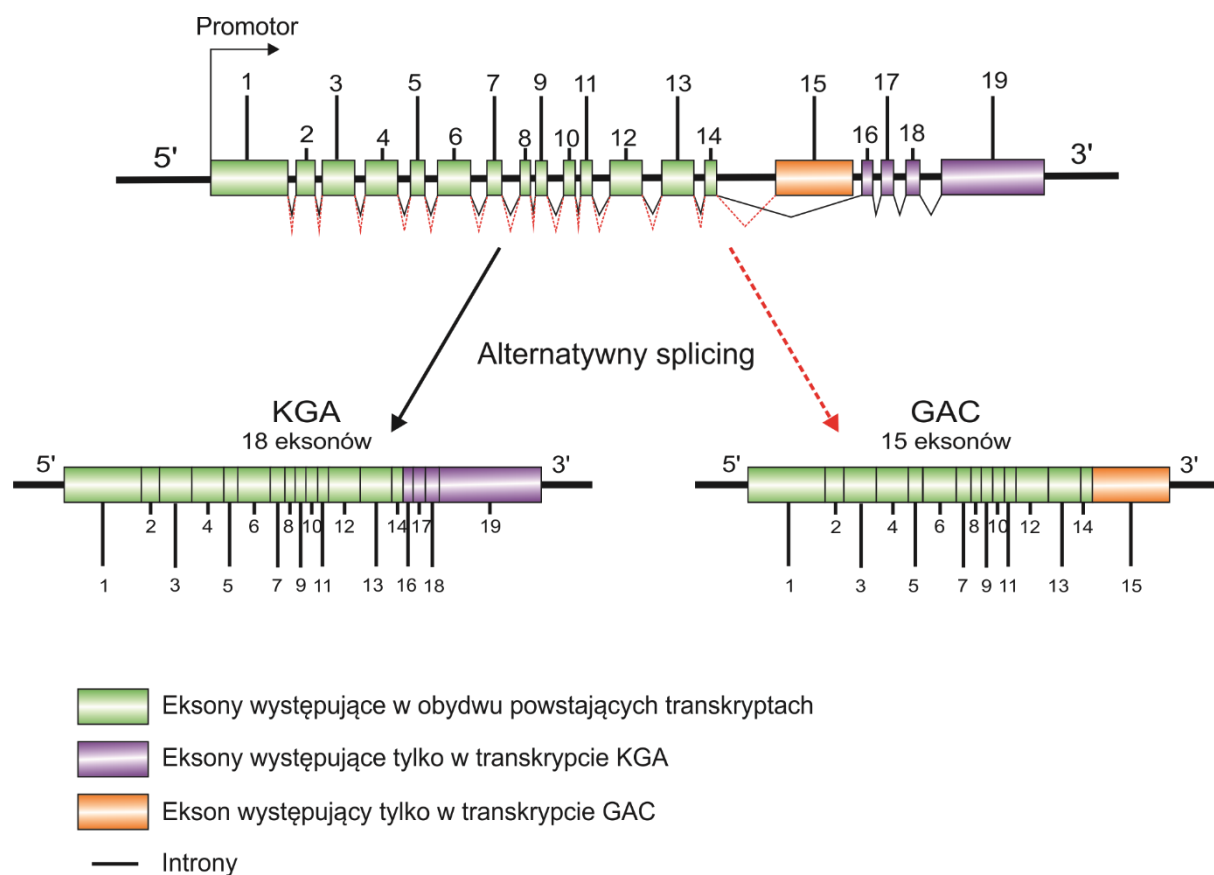
W komórkach ssaków GA kodowana jest przez dwa geny: gen *Gls* koduje izoformy typu nerkowego (kidney-type glutaminase - KGA i GAC), natomiast gen *Gls2* koduje izoformy typu wątrobowego (liver-type glutaminase - GAB i LGA) (Campos-Sandoval i wsp., 2015).

Geny *GLS* i *GLS2* charakteryzują się dużym podobieństwem sekwencji nukleotydowych. Ekson pierwszy wykazuje 62,5% podobieństwa, przy czym koduje tylko 61 aminokwasów w izoformach GA wątrobowej i aż 129 aminokwasów w izoformach GA nerkowej (co skutkuje 67 dodatkowymi aminokwasami na N-końcu). Sekwencje kodowane przez ekson pierwszy zawierają sekwencję sygnałową odpowiedzialną za lokalizację białka w komórce. Ostatni ekson wykazuje zaledwie 29,4% podobieństwa. Sekwencja kodowana przez ten region odpowiada za interakcje z innymi białkami (Márquez i wsp., 2006). Konsekwencją opisanych różnic w sekwencjach może być odmienna lokalizacja komórkowa oraz funkcje pełnione przez te białka (Pérez-Gómez i wsp., 2003).

Poszczególne izoformy GA zostały omówione w odrębnych podrozdziałach.

#### **II.4.1 Glutaminaza typu nerkowego**

Gen *GLS*, kodujący GA typu nerkowego, zlokalizowany jest na chromosomie 2 (2q32.2) (Aledo i wsp., 2000). Składa się z 19 eksonów, z których na drodze alternatywnego splicingu powstają dwa transkrypty: dłuższy - KGA i krótszy - GAC. KGA powstaje z eksonów od 1 do 14 i od 16 do 19, podczas gdy GAC tworzą eksony od 1 do 15 (Ryc. II.2.) (Campos-Sandoval i wsp., 2015).



**Ryc. II.2. Schemat splicingu genu *GLS* i powstające z niego transkrypty.** Na podstawie Campos-Sandoval i wsp., 2015, zmodyfikowane.

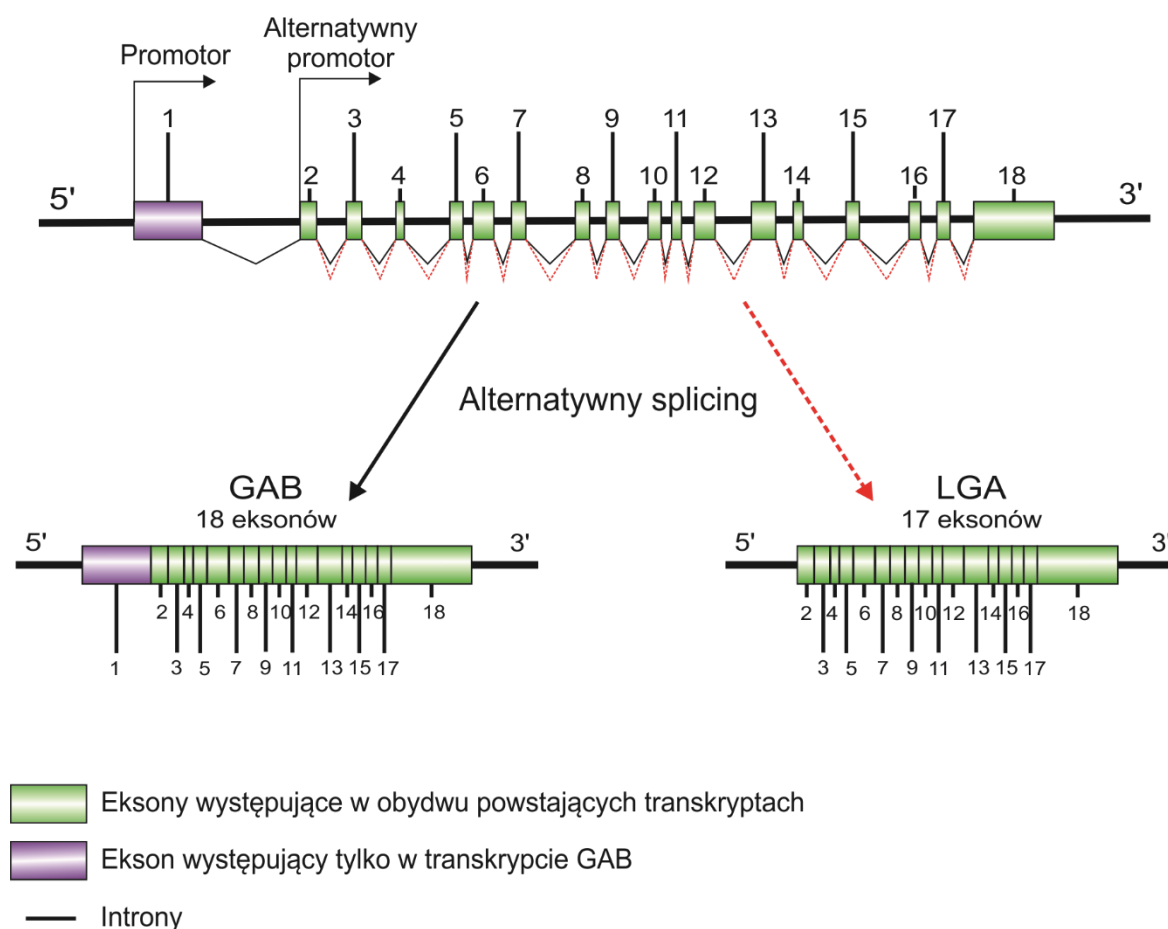
KGA ulega silnej ekspresji w nerce i mózgu, natomiast wykazuje słabszą ekspresję w sercu, płucach, trzustce, łożysku i mięśniach szkieletowych (Turner i McGivan, 2003; Porter i wsp., 2002; Elgadi i wsp., 1999; Aledo i wsp., 2000). Wykazano mitochondrialną lokalizację KGA w neuronach małpy i szczura (Olalla i wsp., 2002) oraz w ludzkich i szczurzych astrocytach (Cardona i wsp., 2015).

Obecność transkryptu GAC została potwierdzona w mięśniu sercowym, trzustce, nerkach, płucach i łożysku, natomiast nie stwierdzono jego obecności w wątrobie (Elgadi i wsp., 1999).

Obie izoformy, KGA i GAC, są aktywowane przez wysokie stężenia nieorganicznego fosforanu i hamowane przez Glu (Curthoys i Watford, 1995; Cassago i wsp., 2012). Stała Michaelisa ( $K_m$ ), określająca stężenie substratu, przy którym szybkość reakcji enzymatycznej jest równa połowie szybkości maksymalnej ( $V_{max}$ ) tej reakcji, dla GA nerkowej i jej substratu Gln jest niska i wynosi 0,6 mM z  $V_{max}$  1,1  $\mu\text{mol/ml/min}$  (Botman i wsp., 2014;).

## II.4.2 Glutaminaza typu wątrobowego

Gen *GLS2* zlokalizowany jest na chromosomie 12 i składa się z 18 eksonów. Dotychczas znane są dwa transkrypty powstające na skutek jego ekspresji: dłuższy - GAB i krótszy – LGA (Campos-Sandoval i wsp., 2015). Transkrypt GAB składa się z 18 eksonów, a miejsce startu transkrypcji zlokalizowane jest na początku 1 eksonu. Z kolei transkrypt LGA powstaje z eksonów 2-18, a alternatywny promotor i miejsce startu transkrypcji znajdują się w 3' końcu 1 intronu genu *GLS2* (Ryc. II.3.) (Martín-Rufián i wsp., 2012).



**Ryc. II.3. Schemat splicingu genu *GLS2* i powstające z niego transkrypty.** Na podstawie Campos-Sandoval i wsp., 2015, zmodyfikowane.

GA wątrobowa zlokalizowana jest głównie w wątrobie i przez długi czas negowano jej obecność w innych tkankach. Nowsze badania potwierdziły jednak ekspresję *Gls2* w mózgu, trzustce i komórkach układu odpornościowego (neutrofilach) (Aledo i wsp., 2000; Castell i wsp., 2004). Ponadto stwierdzono, że transkrypty GAB i LGA ulegają koekspresji w wątrobie i mózgu człowieka, myszy i szczura

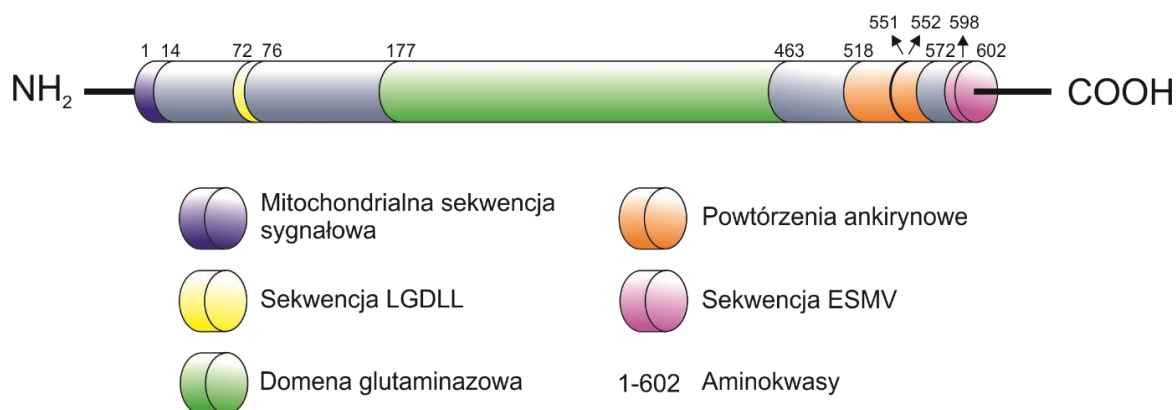
(Martín-Rufián i wsp., 2012). Poziom ekspresji każdej z izoform jest specyficzny zarówno dla gatunku, jak i tkanki: stwierdzono, że GAB jest głównym transkryptem *Gls2* w mózgu szczura, podczas gdy LGA w większym stopniu ulega ekspresji w mózgu myszy. Zjawisko koekspresji zaobserwowano także w odniesieniu do genów *Gls* i *Gls2*: dotychczas kolokalizację KGA z izoformami kodowanymi przez *Gls2* odnotowano w komórkach mózgu (Olalla i wsp., 2002), a także w komórkach nowotworów piersi, wątroby oraz białaczki (Pérez-Gómez i wsp., 2005). Należy jednak nadmienić, że w mózgu ssaków ponad 90% wszystkich transkryptów GA stanowią te kodowane przez *Gls* (Martín-Rufián i wsp., 2012).

GA wątrobowa jest aktywowana przez niskie stężenia nieorganicznego fosforanu i nie jest hamowana przez Glu (Curthoys i Watford, 1995). Charakteryzuje się wysoką  $K_m$  dla Gln (11,6-17 mM) i  $V_{max}$  0,54-0,80  $\mu\text{mol/ml/min}$  (Botman i wsp., 2014).

Początkowo GA wątrobowa była postrzegana jako enzym wyłącznie związany z mitochondrium (Aledo i wsp., 1994). Odkrycie obecności GAB w jądrach komórkowych neuronów w mózgu małpy i szczura (Olalla i wsp., 2002) wskazało nową drogę badań nad funkcjami tej izoformy. Powstała hipoteza, że poza rolą enzymatyczną ta GA może pełnić także inne funkcje w komórce. Możliwe, że na funkcje pełnione przez GAB mogą mieć wpływ motywy białkowe występujące w jej obrębie. Kolejne motywy, zaczynając od N-końca to (Márquez i wsp., 2006) (Ryc. II.4.):

- Sekwencja peptydowa umożliwiająca transport białka do mitochondriów (aminokwasy 1-14) (Gomez-Fabre i wsp., 2000)
- Sekwencja LGDLL, która zlokalizowana jest w pierwszym eksonie GAB (aminokwasy 72-76). Motyw LXXLL umożliwia specyficzne oddziaływania z receptorami jądrowymi i może brać udział w translokacji białek do jądra komórkowego (Meertens i wsp., 1998)
- Domena glutaminazowa (aminokwasy 177-463)
- Dwie reszty ankirynowe (aminokwasy 518-551 i 552-572), które są charakterystyczne dla białek biorących udział w sygnalizacji komórkowej, integralności cytoszkieletu, transkrypcji i regulacji cyklu komórkowego oraz w transporcie komórkowym (Mosavi i wsp., 2004)
- Sekwencja ESMV zlokalizowana w C-końcu odpowiedzialna za oddziaływanie z białkami posiadającymi domenę PDZ. Domeny PDZ pośredniczą m.in.

w oddziaływaniach między białkami i ich prawidłowej lokalizacji komórkowej (Chi i wsp., 2012). Dotychczas dowiedziono oddziaływań produktu białkowego genu *GLS2* poprzez domenę PDZ z białkami SNT (ang.  *$\alpha$ -I-syntrophin*) i GIP (ang. *glutaminase interacting protein*) (Ollala i wsp., 2001) (aminokwasy 598-602).



**Ryc. II.4. Struktura białka GAB.** Na podstawie Márquez i wsp., 2006, zmodyfikowane. Schematyczna ilustracja ludzkiego białka GAB pokazująca główne sekwencje i motywy białkowe. Począwszy od N-końca: mitochondrialna sekwencja sygnałowa, sekwencja LGDLL umożliwiającą oddziaływania z receptorami jądrowymi, domena glutaminazowa, powtórzenia ankirynowe, sekwencja ESMV odpowiedzialna za oddziaływania z domeną PDZ.

Stwierdzenie obecności GAB nie tylko w mitochondriach, ale i jądrach komórkowych neuronów, a następnie astrocytów (Ollala i wsp., 2002; Cardona i wsp., 2014) oraz wykazanie oddziaływań GAB z białkami zawierającymi domenę PDZ (Ollala i wsp., 2001) dało podstawy do stworzenia hipotezy, że poza rolą enzymatyczną GAB może być zaangażowana bezpośrednio lub pośrednio (poprzez oddziaływania z innymi białkami lub poprzez modulację wewnątrzkomórkowego poziomu Gln) w regulację transkrypcji genów. Wpływ GAB na proces transkrypcji został udokumentowany w komórkach GBM transfekowanych sekwencją kodującą to białko (Szeliga i wsp., 2009).



## II.5. Rola glutaminazy w nowotworach

Dotychczasowe badania wskazują, że rozregulowana ekspresja i/lub aktywność izoform GA jest cechą charakterystyczną komórek nowotworowych o różnej histogenezie (Szeliga i Obara-Michlewska, 2009). Należy zwrócić uwagę, że starsze dane dotyczą badań nad GA bez uwzględniania jej izoform.

Dane literaturowe sugerują, że izoformy GA typu nerkowego i wątrobowego pełnią w komórkach nowotworowych przeciwstawne funkcje. Izofomy kodowane przez *GLS* ulegają silnej ekspresji w komórkach intensywnie proliferujących, podczas gdy izofomy kodowane przez *GLS2* są charakterystyczne dla komórek o niskim poziomie proliferacji (Pérez-Gómez i wsp., 2005; Turner i McGivan, 2003; Szeliga i wsp., 2014).

W komórkach linii hepatoblastoma HepG2 wykazano 20-krotnie wyższy poziom transkryptu *GLS2* w porównaniu do *GLS*. Jednakże na poziomie białka zidentyfikowano zbliżone ilości obu izoform, przy czym stwierdzono, że aktywność enzymatyczną w głównej mierze wykazuje nerkowa izoforma GA. Brak korelacji pomiędzy poziomem mRNA a poziomem kodowanego przez niego białka i aktywności enzymatycznej sugeruje istnienie potranskrypcyjnych i/lub potranslacyjnych mechanizmów regulowania GA (Pérez-Gómez i wsp., 2005). Podobnie w komórkach linii raka piersi, ZR-75-1 i MCF-7, wykazano występowanie zarówno nerkowej, jak i wątrobowej izoformy GA, ale aktywność enzymatyczną obserwowaną w tych komórkach przypisuje się głównie izoformie KGA (Pérez-Gómez i wsp., 2005).

Późniejsze prace wykazały obniżony poziom mRNA dla *GLS2* zarówno w licznych komórkach linii raka wątroby (Zhang i wsp., 2013.; Liu i wsp., 2014), jak i komórkach linii raka okrężnicy (Zhang i wsp., 2013) w porównaniu do komórek prawidłowych. Co ważniejsze, stwierdzono obniżenie ekspresji *GLS2* w ludzkich tkankach raka wątroby w porównaniu do tkanek nienowotworowych (Zhang i wsp., 2013; Liu i wsp., 2014). Podobną tendencję zaobserwowano w badaniach prowadzonych na ludzkich tkankach raka okrężnicy (Zhang i wsp., 2013). Przeprowadzone dotychczas badania wskazują, że epigenetyczne wyciszenie *GLS2* w tych przypadkach następuje poprzez hipermetylację promotora tego genu (Zhang i wsp., 2013; Liu i wsp., 2014).

Profil ekspresji poszczególnych izoform GA ulega zmianie także w guzach mózgu różnego pochodzenia. W nienowotworowych tkankach mózgu transkrypty KGA i GAC

wykazują podobny poziom ekspresji, podczas gdy poziom wątrobowej GA stanowi ok. 70% poziomu izoformy KGA. W zwojakoglejaku (ang. *ganglioglioma*, guz pochodzenia neuronalno-glejowego) stwierdzono wysoką ekspresję transkryptu GAC (1,8-krotnie wyższa ekspresja niż mRNA dla KGA), podczas gdy ekspresja mRNA dla GA wątrobowej wynosiła około 20% mRNA GAC. W skąpodrzewiaku (ang. *oligodendroglioma*, guz pochodzenia oligodendroglejowego) stwierdzono nadekspresję mRNA GAC w porównaniu do mRNA KGA, podczas gdy mRNA wątrobowej GA stanowi ok. 60% mRNA GAC. W nowotworach pochodzenia astrocytarnego (gwiaździaku włosowatokomórkowym ang. *pilocytic astrocytoma*, podwyściółkowym gwiaździaku olbrzymiokomórkowym ang. *subependymal giant cell astrocytoma*, SEGA) i ependymalnego (wyściółczaku ang. *ependymoma*) ekspresja mRNA GAC jest wyższa niż ekspresja mRNA KGA, przy jednoczesnej bardzo niskiej ekspresji mRNA GA wątrobowej (Szeliga i wsp., 2008). W tkankach GBM obserwuje się silną ekspresję genu *GLS*, przy braku lub śladowej ekspresji genu *GLS2* (Szeliga i wsp., 2005), czego przyczyną jest, podobnie jak w przypadku raka wątroby i okrężnicy, hipermetylacja DNA w obrębie *GLS2* (Szeliga i wsp., 2016).

Według dotychczasowego stanu wiedzy, ekspresja genu *GLS* jest regulowana przez produkty onkogenów: MYC *via* miR-23 (Gao i wsp., 2009), GTPazy Rho (Cdc42, Rac1, RhoC) (Wang i wsp., 2010) i Notch (Kahlert i wsp., 2016). Ekspresja genu *GLS2* jest zależna od białek supresorowych p53, p63, p73 (Hu i wsp., 2010; Giacobbe i wsp., 2013; Velletri i wsp., 2013).

Zgodnie z tezą zakładającą, że izoformy kodowane przez *GLS* i *GLS2* pełnią przeciwstawne funkcje w kształtowaniu własności biologicznych komórek nowotworowych, badania ostatnich lat dowodzą, że obniżenie indeksu proliferacji czy zdolności migracyjnych komórek nowotworowych o różnej etiologii można osiągnąć poprzez wyciszenie ekspresji genu *Gls* bądź na skutek indukcji ekspresji genu *Gls2*.

Obniżenie ekspresji lub aktywności nerkowej izoformy GA redukuje potencjał proliferacyjny komórek nowotworów różnego pochodzenia, co potwierdziły badania prowadzone na komórkach raka prostaty (Gao i wsp., 2009) i raka piersi (Donadio i wsp., 2008; Wang i wsp., 2010). Wyciszenie KGA w mysich komórkach linii EATC (ang. *Ehrlich ascites tumour cells*) zmienia ich morfologię i prowadzi do obniżenia potencjału proliferacyjnego tych komórek nie tylko w warunkach *in vitro*, ale także

*in vivo* (Lobo i wsp., 2000). Późniejsze badania wykazały, że w komórkach EATC z wyciszoną KGA dochodzi do obniżenia ekspresji kilku genów (*Hmga2*, *Fmnl3*, *Nedd-4*, *Usp-15*) związanych ze wzrostem i proliferacją komórek (Martín-Rufián i wsp., 2006). Zablockowanie ekspresji *GLS* zahamowuje wzrost i proliferację również komórek linii GBM ludzkiego SFxL i LN229 zarówno w warunkach *in vitro* (Cheng i wsp., 2011; Martín-Rufián i wsp., 2014), jak i *in vivo* (Cheng i wsp., 2011) oraz w liniach komórkowych wyprowadzanych z tkanek GBM (Kahlert i wsp., 2016). Ponadto, komórki SFxL i LN229 po wyciszeniu ekspresji *GLS* stają się bardziej podatne na działanie czynników stresu oksydacyjnego oraz wykazują obniżony poziom GSH (Martín-Rufián i wsp., 2014).

Podobne zmiany we własnościach biologicznych komórek nowotworowych można osiągnąć poprzez indukcję ekspresji genu *GLS2*. Nadekspresja *GLS2* w komórkach znacząco zmniejszyła zdolność formowania kolonii komórek nowotworowych raka płuc H1299, ludzkiego GBM HTB15 (U-118 MG) oraz raka wątroby HepG2 (Hu i wsp., 2010). Ponadto, indukcja ekspresji *GLS2* w komórkach raka wątroby Huh-1 i Huh-7 zahamowała proliferację komórek hodowanych w warunkach *in vitro*, jak i rozrost nowotworu *in vivo*. Autorzy pracy jednocześnie wykazali, że obserwowane zmiany mogą być wynikiem negatywnej regulacji szlaku sygnałowego PI3K/AKT przez *GLS2* (Liu i wsp., 2014). Transfekcja komórek T98G sekwencją kodującą GAB spowodowała obniżenie indeksu proliferacji, aktywności mitochondrialnej, zdolności migracyjnych i potencjału do formowania kolonii względem komórek kontrolnych. Wykazano także, że przeprowadzona transfekcja zmienia profil ekspresji licznych genów, spośród których część koduje białka zaangażowane w proces onkogenezy, m.in. *MGMT*, *CAPN2*, *GATA3* (Szeliga i wsp., 2009). Jednocześnie stwierdzono, że komórki T98G transfekowane GAB są bardziej wrażliwe na działanie związków alkilujących (Szeliga i wsp., 2012) oraz czynników stresu oksydacyjnego, w tym nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ) w porównaniu do komórek kontrolnych (Martín-Rufián i wsp., 2014).

Dane literaturowe sugerują, że zmiany obserwowane w komórkach nowotworowych transfekowanych sekwencją GAB mogą być związane z obniżoną ekspresją i/lub aktywnością niektórych elementów zaangażowanych w szlak sygnałowy Wnt. Poniżej krótko scharakteryzowano te z nich, które zostały przebadane w niniejszej pracy.

## II.6. Elementy szlaku WNT

Szlak sygnałowy WNT (skrót WNT powstał z połączenia nazw dwóch genów: *Wg* (*wingless*) i *Int*) odgrywa istotną rolę w regulacji takich procesów jak embriogeneza, różnicowanie, proliferacja i przeżywalność komórek. Związanie liganda WNT z receptorem Fzd (ang. *frizzled receptor*) prowadzi do aktywacji ścieżki kanonicznej, zależnej od  $\beta$ -kateniny lub jednej ze ścieżek niekanonicznych: i). ścieżki zależnej od jonów  $\text{Ca}^{2+}$  lub ii). ścieżki tzw. polarnej (ang. *planar cell polarity*, PCP).

W ostatnich latach szlak WNT stał się istotnym zagadnieniem w tematyce badań nad biologią nowotworów, w tym GBM (Zuccarini i wsp., 2018; McCord i wsp., 2017). Kluczowe jest określenie w jaki sposób przekazywanie sygnału przez elementy szlaku WNT wpływa na procesy inwazyjności, proliferacji i angiogenezy komórek GBM oraz ich oporność na chemio- i radioterapię. Odkrycia mające na celu poznanie składowych szlaku sygnałowego WNT mogą posłużyć do zaprojektowania nowych skuteczniejszych terapii (McCord i wsp., 2017).

### II.6.1 Białko GATA3

Szlak sygnałowy WNT może regulować ekspresję wielu genów, w tym *GATA3* kodującego czynnik transkrypcyjny *GATA3* (ang. *GATA Binding Protein 3*). W komórkach limfocytów Th2 aktywacja szlaku WNT powoduje akumulację  $\beta$ -kateniny i promuje transkrypcję *GATA3* przez przyłączenie SATB1,  $\beta$ -kateniny i acetylotransferazy histonowej p300 do promotora genu *GATA3* (Notani i wsp., 2010). Natomiast zahamowanie przekazywania szlaku WNT zależnego od  $\beta$ -kateniny prowadzi do zmniejszenia ekspresji *GATA3* w tych komórkach (Notani i wsp., 2010). *GATA3* jest białkiem zaangażowanym w regulację licznych procesów takich jak hematopoeza, rozwój gruczołów mlekowych, skóry czy systemu nerwowego (Chou i wsp., 2010). Białko to wykazuje działanie plejotropowe w kształtowaniu fenotypu różnych nowotworów. W przypadku neuroblastoma niski poziom *GATA3* związany jest z pozytywnym rokowaniem dla pacjentów (Peng i wsp., 2015). W raku piersi czy pęcherza moczowego spadek poziomu *GATA3* koreluje ze wzrostem agresywności nowotworu (Yoon i wsp., 2010; Li i wsp., 2014.). *GATA3* wpływa na poziom cytokin, których rozregulowany poziom stwierdzono w GBM, np. IL-10, IL-6, STAT3 (van Hamburg i wsp., 2008; Zhu

i wsp., 2012). Ponadto, ekspresja *GATA3* zależy od poziomu TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$  obniża ekspresję *GATA3*) (van Hamburg i wsp., 2008), który w GBM moduluje procesy proliferacji (Alexandrow i wsp., 1995) inwazyjności (Wesolowska i wsp., 2008) i angiogenezy (Ueki i wsp., 1992). Poziom ekspresji ani rola białka *GATA3* w GBM nie były do tej pory zbadane.

## II.6.2 Kinaza AKT

Kinaza białkowa B (AKT) odgrywa kluczową rolę w regulowaniu wzrostu, przeżywalności, proliferacji, cyklu komórkowego, migracji, apoptozy i metabolizmu glukozy w różnych typach komórek (Manning i Toker, 2017). Aktywacja AKT jest wieloetapowym procesem złożonym z translokacji w pobliże błony komórkowej i fosforylacji tego białka. AKT posiada N-terminalną domenę PH (ang. *pleckstrin homology domain*), która ma duże powinowactwo do fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trisfosforanu (PIP3). Oddziaływanie AKT z PIP3 umożliwia translokację AKT w pobliże błony komórkowej. PIP3 powstaje w wyniku działania PI3K na fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan (PIP2), zatem aktywność PI3K jest niezbędna do translokacji AKT (Bellacosa i wsp., 1998). Kinazy PDK1 (ang. *3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1*) i mTORC2 mają zdolność fosforylowania AKT odpowiednio na Thr308 i Ser473 (Dangelmaier i wsp., 2014; Yang i wsp., 2015). Warto zaznaczyć, że AKT ma zdolność inaktywowania kinazy syntazy glikogenowej (ang. *glycogen synthase kinase 3*, GSK3 $\beta$ ), należącej do szlaku kanonicznego WNT, poprzez jej fosforylację na Ser9. Aktywna GSK3 $\beta$  tworzy kompleks aksyna/GSK3/CK-1/APC, pod wpływem którego  $\beta$ -katenina ulega fosforylacji, a następnie ubikwitynacji i degradacji w proteasomie. Inaktywacja GSK3 $\beta$  prowadzi natomiast do akumulacji  $\beta$ -kateniny i następnie jej translokacji do jądra komórkowego (Majewska i Szeliga, 2017).

Deregulacja szlaku AKT jest cechą charakterystyczną wielu nowotworów o różnej etiologii (Altomare i Testa, 2005; Sun i wsp., 2001; Bleeker i wsp., 2014). Ścieżka AKT odgrywa kluczową rolę w powstawaniu i progresji GBM (Sonoda i wsp., 2001), a jej nadaktywność związana jest ze złymi rokowaniami dla pacjentów z GBM (Suzuki i wsp., 2010; Xue i wsp., 2015). Supresor nowotworowy PTEN jest najszerzej badanym negatywnym regulatorem ścieżki sygnalizacyjnej AKT. PTEN będący fosfatazą ma zdolność defosforylacji PIP3 do PIP2, co prowadzi do hamowania fosforylacji AKT

(Altomare i Testa, 2005). Mutacje, w tym delecje, *PTEN* występują w 60% przypadków GBM (Koul, 2008; Haas-Kogan i wsp., 1998). Obniżenie poziomu AKT lub PI3K w komórkach T98G prowadzi do obniżenia przeżywalności i proliferacji komórek, a także indukcji procesu apoptozy i zwiększenia stosunku ekspresji mRNA *BAX* do *BCL-2*, (Paul-Samojedny i wsp., 2014). AKT reguluje aktywność transkrypcyjną NF- $\kappa$ B, modulatora procesów apoptozy i proliferacji, poprzez fosforylację i degradację inhibitora  $\kappa$ B (*I $\kappa$ B*) (Bai i wsp., 2009).

### III. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Jak wspomniano we *Wstępie* (rozdział II.), śladowy poziom ekspresji *GLS2* lub jej brak został udokumentowany w komórkach nowotworów wywodzących się z różnych tkanek, przy jednoczesnej znacznej ekspresji tego genu w tkankach nienowotworowych. Transfekcja sekwencją kodującą GAB, główną izoformą kodowaną przez *GLS2*, hamuje przeżywalność i proliferację oraz zdolności migracyjne komórek nowotworowych zarówno w modelach *in vitro*, jak i *in vivo*. Powyższe obserwacje dotyczą także komórek linii ludzkiego GBM T98G, które egzogenna GAB dodatkowo uwrażliwia na działanie związków alkilujących i czynników indukujących stres oksydacyjny. Pojawiło się jednak pytanie, czy transfekcja sekwencją kodującą GAB wpłynie w podobny sposób na własności biologiczne komórek innych linii ludzkiego GBM, różniących się od komórek linii T98G pod względem profilu genetycznego i zdolności do tworzenia nowotworów w układzie *in vivo*. Ponadto nadal nieznany jest molekularny mechanizm leżący u podstaw powyższych zjawisk. Coraz liczniejsze doniesienia literaturowe sugerują, że GAB poza funkcją enzymatyczną bierze także udział w regulacji procesu transkrypcji i/lub w transdukcji sygnału. Transfekcja komórek linii T98G sekwencją kodującą GAB zmodyfikowała poziom ekspresji licznych genów, z których część koduje białka związane ze szlakiem sygnałowym WNT, m.in. genu *GATA3*. Z kolei w komórkach raka wątroby podobna manipulacja genetyczna zahamowała aktywność ścieżki AKT. Na podstawie powyższych danych postawiono hipotezę zakładającą, że transfekcja linii GBM sekwencją kodującą GAB moduluje poziom ekspresji i/lub aktywność białek związanych ze szlakami WNT i AKT.

Sformułowano poniższe cele szczegółowe:

1. Ocena wpływu transfekcji sekwencją kodującą GAB na przeżywalność, proliferację i zdolność do migracji oraz wrażliwość na  $H_2O_2$  komórek linii ludzkiego GBM: U87MG i LN229.
2. Ocena wzajemnej zależności poziomów ekspresji genu *GLS2* i genu *GATA3* w komórkach linii GBM oraz w tkankach GBM i nienowotworowych tkankach mózgu.

3. Analiza działania wybranych białek związanych ze ścieżką AKT: AKT, PDK1, PI3K, NF- $\kappa$ B w komórkach GBM transfekowanych sekwencją kodującą GAB oraz komórkach kontrolnych.



## IV. MATERIAŁY I METODY

### IV.1. Linie komórkowe ludzkiego glioblastoma

W doświadczeniach wykorzystywano trzy komercyjnie dostępne linie komórkowe wyprowadzone z komórek ludzkiego glioblastoma o różnym profilu genetycznym i zdolności do tworzenia nowotworów w układzie *in vivo* (Tab IV.1.):

1. Linia T98G pochodziła z American Type Culture Collection (ATCC). Podstawową pożywką wykorzystywaną do hodowli komórek T98G było MEME (ang. *Minimal Essential Medium Eagle*) (Sigma-Aldrich), z 10% zawartością bydlęcej surowicy płodowej (ang. *Fetal bovine serum*, FBS) (Gibco), 1% roztworem aminokwasów (Sigma-Aldrich) oraz antybiotykami: penicyliną (50 U/ml) i streptomycyną (50 mg/ml) (Gibco).

2. Linia U87MG pochodziła z firmy Sigma-Aldrich. Podstawową pożywką wykorzystywaną do hodowli komórek U87MG był EMEM (ang. *Eagle's Minimum Essential Medium*) (ATCC), z 15% zawartością FBS oraz antybiotykami: penicyliną (50 U/ml) i streptomycyną (50 mg/ml) (Gibco).

3. Linia LN229 pochodziła z ATCC. Podstawową pożywką wykorzystywaną do hodowli komórek LN229 był DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco) z dodatkiem glukozy (stężenie końcowe 4,5 g/l), 10% zawartością FBS oraz antybiotykami: penicyliną (50 U/ml) i streptomycyną (50 mg/ml) (Gibco).

**Tab. IV.1. Profil genetyczny komórek linii T98G, U87MG i LN229.**

	T98G	U87MG	LN229	Ref
<i>TP53</i>	mutant zamiana ATG (Met) na ATA (Ile) mutacja w kodonie 237	typ dziki	mutant zamiana CCT (Pro) na CTT (Lys) mutacja w kodonie 98	1, 2
<i>PTEN</i>	mutant zamiana CTT (Leu) na CGT (Arg) mutacja w kodonie 42	Delecja	typ dziki	1, 3
<i>p16</i>	delecja	Delecja	delecja	1, 2
<i>p14<sup>ARF</sup></i>	delecja	Delecja	delecja	1, 2
<i>MGMT</i>	wysoki poziom ekspresji, częściowa metylacja promotora genu (~42%)	brak lub śladowy poziom ekspresji metylacja promotora genu (64-66%)	brak lub śladowy poziom ekspresji metylacja promotora genu (79-100%)	4, 5, 6, 7
Potencjał do tworzenia guzów (ang. <i>tumorigenic potential</i> )	Brak potencjału do tworzenia guzów	Duży potencjał do tworzenia guzów	Duży potencjał do tworzenia guzów	1, 8

1 Ishii i wsp., 1999

2 Kaur, 2003

3 Bhattacharya i wsp., 2016

4 Lan i wsp., 2016

5 Dunn i wsp., 2009

6 Perazzoli i wsp., 2015

7 Gaspar i wsp., 2010

8 Ramão i wsp., 2012

Hodowle prowadzono w temperaturze 37 °C, w atmosferze zawierającej 95% powietrza i 5% CO<sub>2</sub>. Pożywkę zmieniano dwa razy w tygodniu. W eksperymentach wykorzystywano komórki z pasaży od 5 do 25. Pasażowane hodowle były przemywane buforem fosforanowym PBS (Gibco, Sigma-Aldrich), trypsynizowane 0,25% roztworem trypsyny z EDTA (Sigma-Aldrich), a następnie rozcieńczane świeżą pożywką i przenoszone do nowych naczyń hodowlanych. W przypadku eksperymentów, w których istotna była wyjściowa liczba komórek, po trypsynizacji komórki liczono wykorzystując licznik komórek TC20™ Automated Cell Counter (Bio-Rad). Urządzenie umożliwia automatyczne zliczanie komórek oraz odróżnianie żywych komórek od martwych. System detekcji komórek oparty jest na barwieniu błękitem trypanu. W celu określenia gęstości/liczby komórek po trypsynizacji zawieszano je w 1 ml świeżej pożywki. Następnie mieszano 10 µl powstałej zawiesiny komórek z 10 µl 0,4% błękitu trypanu i nakładano połowę objętości mieszaniny na płytkę do liczenia komórek dedykowaną przez producenta (Bio-Rad) i dokonywano pomiaru przy użyciu licznika. W zależności od planowanego doświadczenia materiał hodowano na szalkach o średnicy 10 cm oraz w 6-, 24- lub 96-dołkowych płytkach (Cellstar, Corning, Nunc). Ewentualne zmiany składu pożywki lub modyfikacje czasu hodowli przed doświadczeniami zawarte są w opisie poszczególnych eksperymentów. Potwierdzenie tożsamości linii komórkowych zostało przeprowadzone przez firmę ATCC metodą profilowania STR.

#### **IV.2. Transfekcja komórek glioblastoma**

Komórki T98G, U87MG i LN229 zostały stabilnie stransfekowane wektorem pcDNA3 (Invitrogen) niosącym pełną sekwencję cDNA ludzkiej GAB (GenBank: NM013267) (Szeliga i wsp., 2009) lub pustym wektorem pcDNA3. Transfekcję wykonano przy użyciu Lipofectamine 2000 (Invitrogen) zgodnie z zaleceniami producenta.

Komórki wysiewano na 6-dołkowych płytkach w pożywce bez antybiotyków i hodowano przez dobę, do uzyskania 90-95% konfluencji. Przed transfekcją rozpuszczano 4 µg DNA (pGAB lub pcDNA) w 250 µl pożywki Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen) oraz 4µl Lipofectamine 2000 w 250 µl pożywki Opti-MEM I Reduced Serum Medium. Po upływie 5 minut roztwór Lipofectamine 2000 mieszano

z rozcieńczonym DNA i łagodnie mieszając inkubowano przez kolejne 20 minut w temperaturze pokojowej (ang. *room temperature*; RT). Następnie mieszaninę dodawano do komórek.

Równolegle prowadzono transfekcje kontrolne, dodając do komórek mieszaninę 4 µl odczynnika Lipofectamine 2000 rozpuszczonego w 500 µl Opti-MEM I Reduced Serum Medium bez dodatku wektora lub 500 µl czystej pożywki Opti-MEM I Reduced Serum Medium.

Komórki inkubowano przez 24 godziny w 37°C, w atmosferze zawierającej 95% powietrza i 5% CO<sub>2</sub>. Po tym czasie komórki pasażowano pozostawiając je w świeżej pożywce dedykowanej do danej linii komórkowej o standardowym składzie wzbogaconej o antybiotyk selekcyjny: genetycynę (G418) (BioShop). Oporność na G418 u stabilnie stransfekowanych komórek warunkuje niesiony przez wektor pcDNA3 gen *Neo* kodujący fosfotransferazę neomycyny. Selekcję transfektantów prowadzono do momentu wymarcia komórek z hodowli kontrolnych. Stężenie końcowe G418 ustalane było metodą doświadczalną i wynosiło: dla linii komórkowych T98G i U87MG - 500 µg/ml oraz dla linii LN229 - 750 µg/ml. Otrzymane w ten sposób linie komórek stabilnie stransfekowane wektorem pGAB lub pcDNA, w dalszej części pracy nazwano odpowiednio: TGAB i TpcDNA (transfektanty linii T98G), UGAB i UpcDNA (transfektanty linii U87MG), LNGAB i LNpcDNA (transfektanty linii LN229). Ekspresja GAB w transfektantach monitorowana była metodą RT-PCR.

### **IV.3. Materiał biopsyjny**

W badaniach wykorzystano materiał biopsyjny pochodzący z Kliniki Neurochirurgii i Neurochirurgii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie oraz z Kliniki Neurologii i Neurochirurgii Wydziału Nauk Medycznych Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Pisemna świadoma zgoda została uzyskana od pacjentów, a wszystkie procedury przeprowadzono zgodnie z aprobatą lokalnej Komisji Bioetycznej. Dziewięć przypadków pierwotnego GBM zostało pozyskanych w czasie operacji i natychmiast zamrożonych. Wiek i płeć pacjentów przedstawiono w Tab. IV.2. Materiał był diagnozowany przez neuropatologa zgodnie z kryteriami WHO. Grupa kontrolna składała się z czterech nienowotworowych tkanek mózgu: dwóch tkanek

pochodzących z obrzeża pola operacyjnego guza GBM i dwóch innych uzyskanych podczas dekompresji wewnątrzczaszkowej z powodu ciężkiego urazu mózgu. Wszystkie tkanki kontrolne zostały ocenione przez neuropatologa jako nienowotworowe.

**Tab. IV.2. Dane pacjentów, od których pobrano materiał biopsyjny.**

Tkanki nienowotworowe	Płeć (M/K)	Wiek (lata)	Tkanki GBM	Płeć (M/K)	Wiek (lata)
K1	K	59	G1	K	58
K2	K	60	G2	M	64
K3	M	53	G3	K	65
K4	K	51	G4	K	29
			G5	M	67
			G6	K	73
			G7	K	77
			G8	K	76
			G9	K	68

M/K, Mężczyzna/Kobieta

#### IV.4. Izolacja RNA

RNA izolowano z komórek 24 godziny po pasażu lub z materiału klinicznego. Komórki hodowane na szalkach o średnicy 10 cm po odciążeniu pożywki przemywane były 1 ml buforu PBS i lizowane z wykorzystaniem 1 ml odczynnika Tri-Reagent (Sigma-Aldrich) w RT. Materiał biopsyjny homogenizowano w szklanym homogenizatorze (Whatman) także z użyciem 1 ml Tri-Reagentu w RT. Lizaty komórkowe lub homogenaty tkankowe przenoszono do probówek typu eppendorf.

Następnie, do 1 ml lizatu/homogenatu dodawano 200  $\mu$ l chloroformu (Sigma-Aldrich), próbki wytrząsano i inkubowano 5 minut w RT, a następnie wirowano (12 000 x g, 15 minut, 4°C). Fazę wodną (faza górna) przenoszono do nowych probówek i, w celu strącenia RNA, mieszano z 500  $\mu$ l izopropanolu (Sigma-Aldrich), wytrząsano i inkubowano przez 10 minut w RT. Mieszaninę wirowano (12 000 x g, 10 minut, 4°C). Supernatant usuwano, a uzyskany osad przemywano 1 ml schłodzonego 75% etanolu (Polskie Odczynniki Chemiczne S.A.), a następnie odwirowywano (12 000 x g, 5 minut, 4°C). Osad suszono około 15 minut wykorzystując termoblok (Thermo Block TDB-120, Biosan) nagrzaną do temperatury 36°C, po czym zawieszano go w 20  $\mu$ l wody. W celu inaktywowania RNaz, wodę uprzednio poddawano działaniu 0,1% dietylopirowęglaanu

(DEPC) i autoklawowano. Przygotowaną tak wodę nazwano  $H_2O_{DEPC}$ . Preparaty RNA pozostawiano przez noc w  $4^{\circ}C$ , co zapewniało całkowite rozpuszczenie i rozdyfundowanie RNA.

Stężenie i czystość preparatów RNA oznaczano wykorzystując spektrofotometr NanoDrop ND1000 (Thermo Scientific), mierząc gęstość optyczną (ang. *optical density*, OD) przy długości fali 260 i 280 nm, zgodnie z zasadą, że  $OD_{260} = 1$  odpowiada 40  $\mu g$  RNA, a stosunek  $OD_{260}/OD_{280} = 2$  oznacza czysty RNA. Do reakcji odwrotnej transkrypcji (RT-PCR) stosowano preparaty o stosunku  $OD_{260}/OD_{280}$  wyższym niż 1,7.

#### **IV.5. Reakcja odwrotnej transkrypcji**

Reakcję odwrotnej transkrypcji (ang. *reverse-transcription*, RT) przeprowadzano z użyciem zestawu odczynników High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Mieszaninę reakcyjną, której skład przedstawiono w Tab. IV. 3. inkubowano w termocyklerze (Biometra) stosując następujące warunki:

- 10 minut,  $25^{\circ}C$ ,
- 120 minut,  $37^{\circ}C$ ,
- 5 sekund,  $85^{\circ}C$ .

**Tab. IV.3. Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej w reakcjach odwrotnej transkrypcji.**

Składniki mieszaniny reakcyjnej dostępne komercyjnie:			Objętość [ $\mu$ l]:
Składniki zestawu High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	10× RT Buffer	<i>bufor do reakcji odwrotnej transkrypcji</i>	2
	25× dNTP Mix (100 mM)	<i>mieszanina deoksynukleotydów</i>	0,8
	10× RT Random Primers	<i>primery</i>	2
	MultiScribe™ Reverse Transcriptase	<i>odwrotna transkryptaza</i>	1
<b>Pozostałe składniki mieszaniny reakcyjnej:</b>			
cDNA	2 $\mu$ g (objętość każdorazowo obliczano na podstawie pomiaru stężenia RNA)		
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	Dopełniono do całkowitej objętości mieszaniny 20 $\mu$ l		

#### IV.6. Reakcja łańcuchowa polimerazy

Reakcję łańcuchowej polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR) przeprowadzano z użyciem odczynników Taq DNA Polymerase, recombinant (5 U/ $\mu$ l) (Applied Biosystems) oraz Deoxynucleotide Set (o stężeniu wyjściowym 100 mM) (Sigma-Aldrich). Oligonukleotydy wykorzystywane w reakcji zsyntetyzowane zostały w Pracowni Sekwencjonowania i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki (IBB) PAN w Warszawie. Mieszaninę reakcyjną, której skład przedstawiono w Tab. IV.4. inkubowano w termocyklerze (Biometra) według następującego schematu:

- Denaturacja wstępna nici cDNA (5 minut, 94°C)
  - Denaturacja nici cDNA (1 minuta, 94°C)
  - Przyłączanie starterów (ang. *annealing*) do nici cDNA, odpowiednio dla:
    - *GLS2* (1 minuta, 58°C)
    - *ACT $\beta$*  (1 minuta, 62°C)
  - Wydłużanie łańcucha (ang. *extending*) (1 minuta, 72°C)
  - Końcowe wydłużanie: (10 minut, 72°C)
- } 30 cykli

Przy czym etapy: denaturacji, przyłączania starterów oraz wydłużania łańcucha obejmowały 30 cykli.

Sekwencje poszczególnych starterów i geny, do których są komplementarne oraz długości otrzymywanych produktów w parach zasad (pz) (ang. *base pair*, bp) przedstawia Tab. IV.5. Sekwencje starterów wykorzystywane do amplifikacji transkryptu *GLS2* są komplementarne względem sekwencji zlokalizowanej w obrębie 1 eksonu genu *GLS2*, zatem amplifikowany fragment identyfikuje izoformę GAB pomijając izoformę LGA.

**Tab. IV.4. Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej w reakcji PCR.**

Składniki mieszaniny reakcyjnej dostępne komercyjnie:			Objętość [μl]:
Deoxynucleotide Set	dNTP Mix (10 mM)	<i>mieszanina deoksynukleotydów</i>	1
Składniki zestawu Taq DNA Polymerase, recombinant (5 U/μl)	Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	<i>polimeraza</i>	1
	10 x Bufor z (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	<i>bufor do reakcji PCR</i>	2,5
	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	<i>chlorek magnezu</i>	2
Oligo, IBB PAN	Startery (10 μM)	<i>starter F (forward) i starter R (revers)</i>	2 x 1
<b>Pozostałe składniki mieszaniny reakcyjnej:</b>			
cDNA			2
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>			14,5
<b>Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej:</b>			<b>25</b>

**Tab. IV.5. Startery stosowane w reakcjach PCR.**

Symbol genu	Nazwa genu	Numer sekwencji w bazie GenBank	Sekwencje starterów (5' → 3')	Pozycje starterów w genie	Długość produktu (pz)
<i>GLS2</i>	glutaminaza typu wątrobowego	NM_013267	F tccagctgtgttctgtggag R ggaggatggctcctgataca	1322-1341 1546-1527	224
<i>ACTβ</i>	β-aktyna	NM_001101	F tccttctctgggcatggagt R aaagccatgccaatctatc	866-884 1284-1265	418



#### IV.7. Elektroforeza w żelu agarozowym

Produkty reakcji PCR rozdzielano w 1% żelu agarozowym. Agarozę (Prona) rozpuszczano na ciepło w buforze TBE (50 mM Tris, 0,5 mM EDTA, 50 mM kwas borowy, pH 8,3) i uzupełniano bromkiem etydyny (Sigma-Aldrich) do końcowego stężenia 0,3 µg/ml. Na żel nanoszono 15 µl produktu GAB i 3 µl 6x stężonego buforu obciążającego Loading Dye, 6x (Promega) lub 5 µl produktu ACTβ i 1 µl buforu obciążającego Loading Dye. Elektroforezę prowadzono w buforze TBE przy stałym natężeniu 7-8 V/cm, stosując jako marker długości wizualizowanego produktu 1 kb DNA Ladder (Promega). Produkty PCR oglądano wykorzystując system G-Box (SynGene).

#### IV.8. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym

Poziom mRNA genów: *GATA3*, *PDPK1*, *PIK3R3*, *AKT1*, *ACTβ* określono stosując metodę PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR*; RT-PCR). Do analizy stosowano sondy (znakowane fluorescencyjnie startery) TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems lub Blirt) (Tab. IV.6.) oraz komercyjnie dostępne zestawy do real-time PCR: TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) lub TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). W każdym doświadczeniu jako gen referencyjny stosowano *ACTβ* (Applied Biosystems lub Blirt).

**Tab. IV.6. Sondy TaqMan stosowane w reakcji Real-Time PCR.**

Nazwa producenta	Symbol genu	Nazwa genu	Numer referencyjny sondy TaqMan (ang. assay ID)	Długość produktu (pz)
Applied Biosystems	<i>GATA3</i>	GATA binding protein 3	Hs00231122_m1	80
	<i>PDPK1</i>	3-phosphoinositide dependent protein kinase 1	Hs00928927_m1	77
	<i>PIK3R3</i>	phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 3	Hs01103591_m1	107
	<i>AKT1</i>	AKT serine/threonine kinase 1	Hs00178289_m1	66
	<i>ACTB</i>	beta actin	Hs99999903_m1	171
Blirt	<i>ACTB</i>	beta actin	HK-DD-hu	92

Do reakcji real-time PCR używano 1  $\mu$ l matrycy cDNA (reakcje prowadzono w trzech powtórzeniach), a całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej (skład: Tab. IV.7.) wynosiła 10  $\mu$ l. Reakcję przeprowadzono stosując następujące warunki w zależności od stosowanego Master Mixa (Tab. IV.8.). Względną zmianę poziomu mRNA liczono według metody  $\Delta\Delta$ Ct (Livak i Schmittgen, 2001).

**Tab. IV.7. Skład mieszaniny reakcyjnej w reakcji real-time PCR.**

Składniki mieszaniny reakcyjnej	Objętość [ $\mu$ l]:
cDNA	1
TaqMan Gene Expression Assay	0,5
TaqMan Universal PCR Master Mix lub TaqMan Fast Universal PCR Master Mix	5
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	3,5
<b>Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej</b>	<b>10</b>

**Tab. IV.8. Warunki prowadzenia reakcji real-time PCR.**

	<b>TaqMan Universal PCR Master Mix</b>	<b>TaqMan Fast Universal PCR Master Mix</b>
Aktywacja polimerazy	➤ 10 minut, 95°C	➤ 20 sekund, 95°C
Liczba cykli	40	45
Warunki pojedynczego cyklu	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 15 sekund denaturacji, 95°C</li> <li>➤ 1 minuta przyłączenia, 60°C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 3 sekundy denaturacji, 95°C</li> <li>➤ 30 sekund przyłączenia, 60°C</li> </ul>

#### IV.9. Test MTT

Test MTT jest kolorymetrycznym testem do oceny aktywności metabolicznej komórek. Oparty jest na zdolności enzymu (mitochondrialnej dehydrogenazy bursztynianowej) do przekształcania żółtej, rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenyloctetrazoliowy) do nierozpuszczalnego w wodzie ciemnoniebieskiego formazanu.

Komórki wysiewano na 96-dołkowe płytki w gęstości 5 tys. komórek/dołek i inkubowano przez 48 godzin w standardowej pożywce. Po tym czasie pożywkę usuwano, komórki płukano buforem PBS i inkubowano w roztworze MTT w pożywce (końcowe stężenie 0,5 mg/ml) (Sigma-Aldrich) przez 1 godzinę. Następnie pożywkę zawierającą MTT zastępowano dimetylosulfotlenkiem (ang. *dimethyl sulfoxide*, DMSO). Absorbancję proporcjonalną do liczby żywych komórek odczytywano przy 570 nm w spektrofotometrze (Elisa BioRad Microplate Reader).

W przypadku badań dotyczących wrażliwości komórek na działanie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 24 godziny po wysianiu komórki poddawano działaniu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> przez 15, 30, 45 lub 60 minut. Stosowano następujące stężenia H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 50, 100, 200, 300 μM dla komórek linii T98G i ich transfektantów oraz 5, 10, 25, 50 μM dla komórek linii U87MG i LN229 oraz ich transfektantów. Po upływie czasu inkubacji pożywkę zawierającą H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> usuwano i wykonywano test MTT według standardowego protokołu opisanego powyżej.

W eksperymencie z PDGF-BB, komórki pcDNA i GAB inkubowano z PDGF-BB przez 24 godziny, a następnie badano ich wrażliwość na działanie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Stosowano dwa stężenia PDGF-BB (10 ng/ml i 50 ng/ml) dobrane na podstawie danych literaturowych (Zheng i wsp., 2010) oraz rekomendacji producenta (Cell Signaling). Stężenie oraz czas inkubacji komórek z H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wytypowano w oparciu o wyniki eksperymentu opisanego w podrozdziale V.6., w którym komórki transfekowane GAB wykazały większą wrażliwość na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w porównaniu do komórek kontrolnych. Eksperymentem kontrolnym były komórki pcDNA i GAB, którym podawano 20 mM roztwór cytrynianu sodu o pH 3,0 służący do rozpuszczenia PDGF-BB.

#### **IV.10. Test proliferacji**

W celu określenia aktywności proliferacyjnej komórek oceniano ilość 5-bromo-2'-deoksyurydyny (ang. bromodeoxyuridine, BrdU), analogu tymidyny, wbudowanej w genomowy DNA dzielących się komórek. Ilość BrdU wbudowanej do DNA oznaczano kolorymetrycznie za pomocą zestawu Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) (Roche).

Komórki wysiewano na 96-dołkowe płytki w gęstości 5 tys. komórek/dołek i inkubowano przez 48 godzin w pożywce o standardowym składzie. Po tym czasie wykonywano test BrdU zgodnie z zaleceniami producenta. Do pożywki dodawano BrdU na kolejne 2 godziny hodowli. Po wyznakowaniu komórek pożywkę usuwano, a komórki na płytce utrwalano 200 µl odczynnika FixDenat z zestawu (30 minut, RT). Następnie komórki inkubowano z przeciwciałem anti-BrdU (90 minut, RT) skoniugowanym z HRP. Po 3-krotnym odpłukaniu (Washing solution/PBS), komórki inkubowano (30 minut, RT) z substratem dla HRP (100 µl). Po upływie 20 minut inkubacji absorbancję mierzono w czytniku spektrofotometrycznym (MR680, Bio-Rad) przy długości fali 415 nm.

#### **IV.11. Test formowania kolonii**

W celu określenia zdolności komórek do formowania kolonii, komórki wysiewano na płytce 6-dołkowej w gęstości 100 komórek/dołek w pożywce o standardowym

składzie, a następnie prowadzono standardową hodowlę przez okres 3 tygodni (zmieniając pożywkę 2 razy w tygodniu). Po tym czasie pożywkę usuwano, komórki przemywano roztworem PBS, a uformowane przez komórki kolonie utrwalano 4% PFA, barwiono roztworem Giemsy i widoczne gołym okiem kolonie zliczano.

#### **IV.12. Test migracji**

Do oceny zdolności migracyjnych komórek wykorzystano test rysy (ang. *scratch assay*). Komórki wysiewano na 24-studzienkowych płytkach w gęstości 250 tys. w pożywce nie zawierającej FBS i hodowano przez 24 godziny do uzyskania konfluentnych hodowli. Następnie w każdej studzience końcówką sterylnego tipsa w jednolitej warstwie komórek wykonywano rysę. Bezpośrednio po wykonaniu rysy oraz 24 godziny później wykonywano zdjęcia komórek przy pomocy mikroskopu Juli Smart cell analyzer (Bulldog Bio). Zdolności migracyjne komórek określano poprzez pomiar dystansu pomiędzy krawędziami rysy.

#### **IV.13. Oznaczanie zawartości glutaminy i glutaminianu wewnątrzkomórkowego metodą HPLC**

Po 24 godzinach hodowli w standardowych warunkach komórki przepłukiwano trzykrotnie zimnym PBS, zeskrobywano skrobaczką w 1 ml PBS i odwirowywano w probówkach typu eppendorf (2 500 x g, 5 minut, 4°C). Do osadu komórek dodawano 75 µl 10% kwasu sulfosalicylowego i inkubowano je 10 minut w lodzie. Próbkę wirowano (12 000 x g, 10 minut, 4°C). Zbierano supernatant i doprowadzono jego pH do 7,0 przy pomocy 10 M KOH. Osad białka natomiast rozpuszczano w 200 µl 1 M NaOH i oznaczano w nim stężenie białka metodą Bradford.

Stężenie Gln i Glu mierzono za pomocą metody wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (ang. *high pressure liquid chromatography*, HPLC) z odwróconym układem faz, z detekcją fluorymetryczną.

Pomiar zawartości aminokwasów (Gln i Glu) poprzedzono wyznaczeniem krzywej standardowej, na podstawie której wyznaczano stężenie Gln i Glu w poszczególnych

próbkach. Do rozdzielania używano systemu w którego skład wchodziły: pompa Ultimata 3000 (Dionex), autosampler Gina 50 (Dionex), kolumny ze złożem Hypersil Gold (Thermo), oraz detektor fluorometryczny RF 2000 (Dionex). Aminokwasy w próbkach przed podaniem na kolumnę upochadniano do produktu fluorescencyjnego w reakcji z dialdehydem orto-ftalowym (OPA), w obecności  $\beta$ -merkaptoetanolu. Podczas rozdzielania fazę ruchomą stanowiła mieszanina metanolu i 50 mM buforu fosforanowego ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), pH 6,2. Elucję, przy prędkości przepływu 1,2 ml/min. prowadzono izokratycznie (10% metanol /90% bufor fosforanowy) do 6 minut. Fluorometrycznego pomiaru pochodnych OPA dokonywano przy długościach fal detektora: 370 nm (wzbudzenie) oraz 450 nm (emisja). Czas retencji dla Glu wynosił ok. 3 minuty, a dla Gln ok. 5 minut. W celu przepłukania kolumny przed kolejnym rozdziałem, zwiększano gradientowo udział metanolu w fazie ruchomej do 70%, po czym powracano do wyjściowego składu fazy ruchomej.

#### **IV.14. Oznaczanie białka**

W próbkach traktowanych NaOH białko oznaczano metodą Bradford, natomiast w próbkach do Western blot (WB), w buforach lizujących z NP-40 lub RIPA, metodą BCA.

##### **IV.14.1. Metoda Bradford**

W metodzie Bradford (Bradford, 1976) wykorzystuje się zdolność wiązania barwnika błękitu brylantowego - Coomassie Brilliant Blue z grupami aminowymi białek. Próbki traktowane NaOH przed oznaczeniem białka rozcieńczano 10-krotnie. Trzydzieści  $\mu\text{l}$  lizatu komórkowego po rozcieńczeniu (lub standardu do krzywej wzorcowej) наносono (w trzech powtórzeniach) do dołków na płytce 96-dołkowej i dodawano 270  $\mu\text{l}$  odczynnika Bradford (0,01% Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,8% etanol, 8,5% kwas ortofosforowy). Pomiaru absorbancji dokonywano przy długości fali 595 nm za pomocą spektrofotometru (MR680, Bio-Rad). Stężenie białka wyznaczano na podstawie krzywej wzorcowej wykreślonej dla wartości absorbancji roztworów albuminy (BSA; BioShop) o stężeniach: 0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10  $\mu\text{g}/\text{próbkę}$  w 0,5 M NaOH.

#### IV.14.2. Metoda BCA

Oznaczanie białek metodą BCA, która jest modyfikacją metody biuretowej, opiera się na zdolności białek do redukcji jonów  $\text{Cu}^{2+}$  do  $\text{Cu}^+$ , oraz zdolności  $\text{Cu}^+$  do tworzenia barwnych kompleksów z kwasem bis-cynchoninowym (BCA). Mierzone próbki białka 10-krotnie rozcieńczano i oznaczano przy użyciu zestawu BCA Protein Assay Kit (Pierce) wg zaleceń producenta. Dwadzieścia pięć  $\mu\text{l}$  badanej próby lub standardu nanoszono (w trzech powtórzeniach) do dołka na płytce 96-dołkowej. Następnie dodawano 200  $\mu\text{l}$  odczynnika sporządzonego poprzez zmieszanie roztworów „A” i „B” w stosunku 50:1. Po 30 minutach inkubacji w  $37^\circ\text{C}$  mierzono absorbancję przy długości fali 570 nm w spektrofotometrze (MR680, Bio-Rad). Zawartość białka obliczano na podstawie krzywej wzorcowej wykreślonej dla wartości absorbancji roztworów BSA o stężeniach 0; 0,025; 0,125; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2 mg/ml).

#### IV.15. Izolacja białek i Western blot

Izolację białka z komórek lub z materiału biopsyjnego przeprowadzono z użyciem buforów, których składy podano w Tab. IV.9.

**Tab. IV.9. Składy buforów lizujących stosowanych do izolacji białek.**

Skład buforu RIPA (ang. <i>radio-immunoprecipitation assay</i> ) stosowanego w badaniach dotyczących GLS2, GATA3	Skład buforu stosowanego w badaniach dotyczących szlaku pAKT
0,01 M fosforan sodu (pH 7,2)	50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
0,15 M NaCl	0,15 M NaCl
0,1% SDS	5 mM EDTA
1% deoksycholalan sodu	0,5% NP-40 (Igepal; Fluka)
1% NP-40 (Igepal; Fluka)	-
2 mM EDTA	-

Na świeżo do każdego buforu dodawano 50 mM fluorek sodu (Sigma-Aldrich), inhibitory proteaz (1:200) (Sigma-Aldrich) i fosfatyz (1:100) (Sigma-Aldrich).

Komórki rosnące na szalkach o średnicy 10 cm 24 godziny po pasażu przepłukiwano PBS, zeskrobywano skrobaczką w 1 ml PBS i odwirowywano w probówkach typu eppendorf (2 500 x g, 5 minut, 4°C). Znad osadu komórek usuwano supernatant i dodawano 100 µl buforu lizującego. Lizat komórkowy poddawano sonifikacji (na lodzie) i wirowano (12 000 x g, 5 minut, 4°C). Materiał kliniczny homogenizowano w szklanym homogenizatorze (Whatman) z użyciem 200 µl buforu lizującego (RIPA). Homogenaty tkankowe przenoszono do probówek typu eppendorf, poddawano sonifikacji (na lodzie) i wirowano (12 000 x g, 5 minut, 4°C). Stężenie białka w zebranych supernatantach oznaczono stosując metodę BCA.

Równe ilości białka (30 µg lub 50 µg w przypadku oznaczeń białka GATA3) nakładano na denaturujący żel poliakrylamidowy (10%) i dokonywano rozdzielania elektroforetycznego białek (ang. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) w buforze do elektroforezy (25 mM Tris, 192 mM glicyna, 0,1% SDS, pH 8,3), w aparacie firmy BioRad (napięcie 150 mV, ok. 1,5 godziny do czasu rozwinięcia białek na żelu). W celu identyfikacji wielkości rozdzielanych białek, na żel razem z próbkami nakładano marker Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards 10-250 kDa (Bio-Rad). Transfer białek z żelu na membranę nitrocelulozową (Bio-Rad) prowadzono w buforze do transferu półsuchego (48 mM Tris, 39 mM glicyna, 20% metanol, 0,0375% SDS), w aparacie Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (25V, 1A, 30 minut) (Bio-Rad). Wydajność transferu sprawdzano stosując barwienie roztworem odczynnika Ponceau S (Sigma-Aldrich).

Membranę z białkami po transferze inkubowano przez 1 godzinę w RT w 5% roztworze mleka odtłuszczonego lub BSA w TBS-T (ang. *tris-buffered saline with Tween-20*), w celu zablokowania miejsc niespecyficznego wiązania przeciwciał. Następnie membranę inkubowano z określonym przeciwciałem pierwszorzędowym (w Tab. IV.10. przedstawiono dokładne warunki stosowane dla poszczególnych przeciwciał), płukano trzykrotnie po 10 minut TBS-T i inkubowano 1 godzinę w RT z przeciwciałem drugorzędowym (Sigma-Aldrich, 1:20 000, w 2,5% odtłuszczonego mleka lub BSA w TBS-T), skoniugowanym z peroksydazą chrzanową (ang. *horse raddish peroxidase*, HRP) (Sigma-Aldrich). Przed wywołaniem, membranę przepłukiwano trzykrotnie i inkubowano 2 minuty z substratem dla HRP, SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce). Detekcji sygnału chemiluminescencyjnego dokonywano wykorzystując kliszę światłoczułą Lumi-Film



Chemiluminescent Detection Film (Roche). Następnie membranę przepłukiwano TBS-T i usuwano białka związane z membraną (tzw. stripping) za pomocą roztworu 0,1 M glicyny o pH 2,9. Po strippingu membranę ponownie blokowano w 5% odtłuszczonego mleku w TBS-T. Po przepłukaniu TBS-T, membranę inkubowano przez 1 godzinę z przeciwciałem anti-GAPDH skoniugowanym z HRP. Analizę densytometryczną prążków wykonywano za pomocą oprogramowania GeneTools (SynGene). Wyniki przedstawiano jako iloraz sygnału badanego białka do białka referencyjnego (GAPDH) i porównywano do kontroli (wyniki wyrażono jako procent komórek typu dzikiego). Skład żeli używanych do WB przedstawia Tab. IV.11. (wszystkie odczynniki potrzebne do ich sporządzenia zakupiono w firmie Sigma-Aldrich).

Tab. IV.10. Warunki inkubacji z przeciwciałami pierwszorzędowymi.

Nazwa stosowanego przeciwciała I°	Numer katalogowy, producent	Stężenie przeciwciała	Stosowany roztwór	Czas i temperatura inkubacji
Anty-GLS2	#ab113509, Abcam	1:4 000	2,5% odtłuszczone mleko w TBS-T	przez noc, 4°C
Anty-GATA3	#ab199428, Abcam	1:1 000	2,5% odtłuszczone mleko w TBS-T	przez noc, 4°C
p-Akt (Thr308)	#4056, Cell Signaling	1:1 000	2,5% BSA w TBS-T	przez noc, 4°C
p-Akt (Ser 473)	#4060, Cell Signaling	1:2 000	2,5% BSA w TBS-T	przez noc, 4°C
AKT	#4691, Cell Signaling	1:1 000	5% BSA w TBS-T	przez noc, 4°C
p-PDK1 (Ser241)	#ab109460, Abcam	1:1 000	2,5% BSA w TBS-T	2 godziny, RT
PDK1	#17086-1-AP, Proteintech	1:1 000	2,5% BSA w TBS-T	przez noc, 4°C
p-PI3K (Tyr199)	#4228, Cell signaling	1:1 000	2,5% BSA w TBS-T	przez noc, 4°C
PI3K	#11889, Cell Signaling	1:1 000	2,5% BSA w TBS-T	przez noc, 4°C
p-NF-κβ (Ser536)	#MAB72261, Novus Biologicals	1:1 000	2,5% BSA w TBS-T	przez noc, 4°C
NF-κβ	#4764, Cell Signaling	1:1 000	2,5% BSA w TBS-T	przez noc, 4°C
GAPDH	#HRP-60004, Proteintech	1:20 000	2,5% odtłuszczone mleko w TBS-T	1 godzina, RT

**Tab. IV.11. Skład żeli używanych do elektroforezy.**

<b>Żel rozdzielający</b>	<b>Żel zagęszczający</b>
10% akrylamid/bisakrylamid (stosunek wagowy 73:1)	4% akrylamid/bisakrylamid, (stosunek wagowy 73:1)
0,375 M Tris-HCl (pH 8,8)	0,125 M Tris-HCl (pH 6,8)
0,1% SDS	0,1% SDS
0,05% TEMED	0,1% TEMED
0,05% nadsiarczan amonu	0,05% nadsiarczan amonu

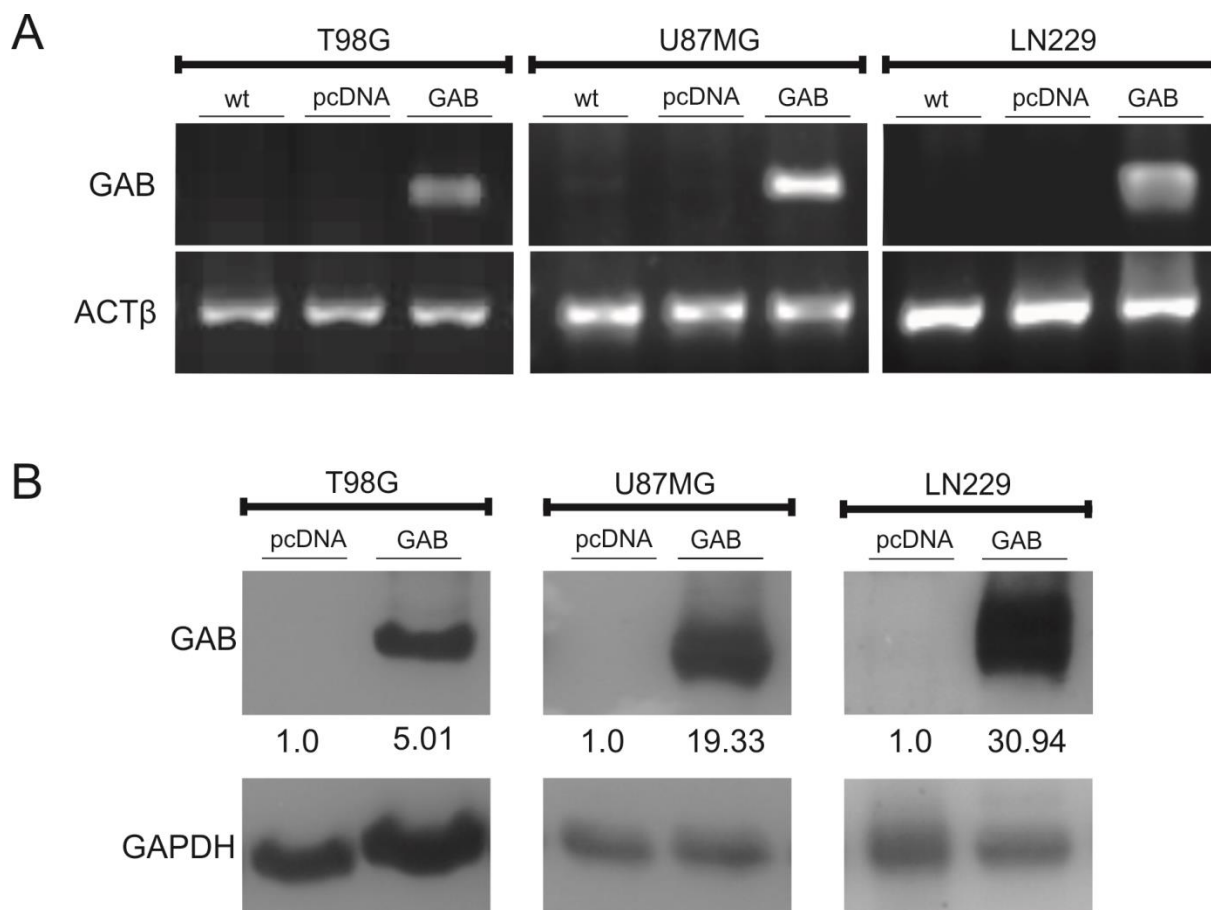
#### **IV.16. Analiza statystyczna wyników**

Wszystkie wyniki wyrażano jako średnie arytmetyczne  $\pm$  odchylenie standardowe (ang. *standard deviation*, SD). Liczbę doświadczeń podano w legendzie do każdej ryciny. Analizę statystyczną przeprowadzano przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism 5.0, stosując testy: t-Studenta (w przypadku porównywania dwóch grup) oraz ANOVA z testem *post hoc* Tukey'a (w przypadku porównywania więcej niż dwóch grup). Poziom ufności  $p < 0,05$  uznawano za znamienne statystycznie.

## V. WYNIKI

### V.1. Ekspresja genu *GLS2* i poziom kodowanego przez niego białka w wybranych komórkach linii glioblastoma

Komórki linii ludzkiego GBM U87MG i LN229 poddano stabilnej transfekcji wektorem pGAB zawierającym pełną sekwencję cDNA kodującego ludzką GAB lub pustym wektorem pcDNA3. Punktem odniesienia były komórki linii T98G, w których wpływ transfekcji sekwencją kodującą GAB na ich własności został już zbadany (Szeliga i wsp., 2009). Transfekcja komórek T98G pustym wektorem lub wektorem niosącym sekwencję GAB została przeprowadzona ponownie na potrzeby niniejszej pracy. Powstałe transfektanty nazwano odpowiednio TGAB, UGAB, LNGAB oraz TpcDNA, UpcDNA i LNpcDNA. Analiza RT-PCR wykazała znaczny poziom ekspresji mRNA kodującego GAB w komórkach transfekowanych GAB (-GAB) (\* $p < 0,05$ ) przy braku jego ekspresji w komórkach kontrolnych transfekowanych pustym wektorem (-pcDNA) oraz komórkach dzikich (ang. *wild type*, wt) (Ryc. V.1.A). Na podstawie analizy densytometrycznej stwierdzono także znacząco wyższy poziom białka GAB w komórkach transfekowanych GAB (\* $p < 0,05$ ) w porównaniu do komórek pcDNA (Ryc. V.1.B).



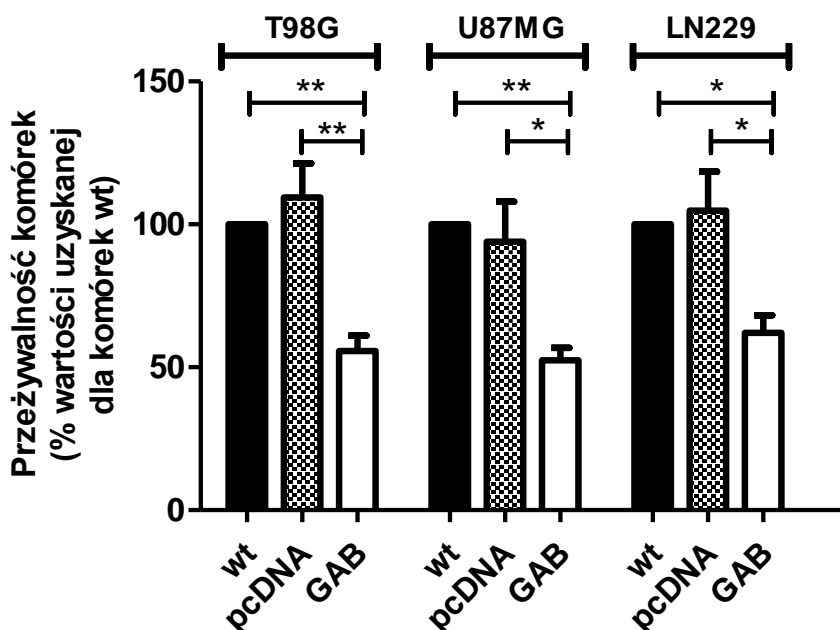
**Ryc. V.1. Analiza poziomu GAB w komórkach linii T98G, U87MG i LN229 dzikich (wt), stabilnie stransfekowanych pustym wektorem (pcDNA) lub wektorem niosącym pełną sekwencję GAB (GAB).** (A) Poziom transkryptu *GAB* i *ACT $\beta$*  analizowany metodą RT-PCR. (B) Poziom białka GAB i GAPDH analizowany metodą WB. Zastosowane przeciwciało anti-GLS2 wykrywa obie izoformy powstające z genu *GLS2*.

## V.2. Wpływ transfekcji sekwencją kodującą GAB na własności biologiczne wybranych linii ludzkiego glioblastoma

Komórki transfekowane sekwencją GAB oraz komórki kontrolne poddano testom weryfikującym ich przeżywalność oraz zdolności proliferacyjne i migracyjne.

### V.2.1 Przeżywalność komórek

Przeżywalność komórek TGAB mierzona testem MTT była o 44% (\*\* $p < 0,01$ ) niższa w porównaniu do komórek kontrolnych T98G i TpcDNA. Obniżenie aktywności mitochondrialnej zaobserwowano także w komórkach UGAB i LNGAB w porównaniu do komórek linii kontrolnych, odpowiednio o 48% (\* $p < 0,05$  *versus* UpcDNA; \*\* $p < 0,01$  *versus* U87MG) i 38% (\* $p < 0,05$ ) (Ryc. V.2.). Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic między komórkami wt i pcDNA poszczególnych linii.

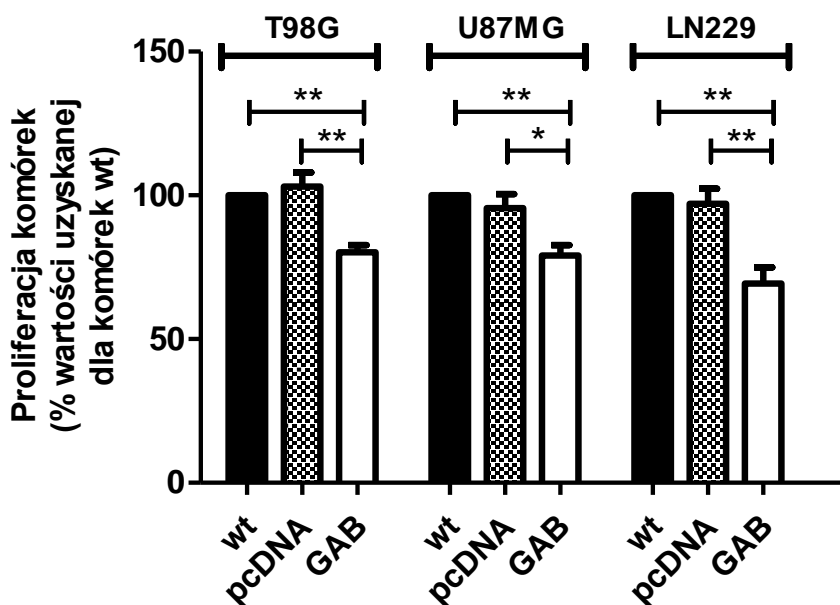


**Ryc. V.2.** Wpływ transfekcji sekwencją kodującą GAB na przeżywalność komórek T98G, U87MG i LN229 analizowaną testem MTT. Wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z 4 niezależnych doświadczeń wyrażoną jako procent wartości uzyskanej dla komórek dzikich (wt). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  *versus* komórki wt i pcDNA (One-way ANOVA z testem *post hoc* Tukey'a).

### V.2.2 Proliferaacja komórek

Transfekcja komórek T98G, U87MG i LN229 sekwencją kodującą GAB znacząco obniżyła aktywność proliferacyjną tych komórek. Przeprowadzona analiza wykazała zahamowanie proliferacji o 20% (\*\* $p < 0,01$ ) w komórkach TGAB, 21% (\* $p < 0,05$  *versus*

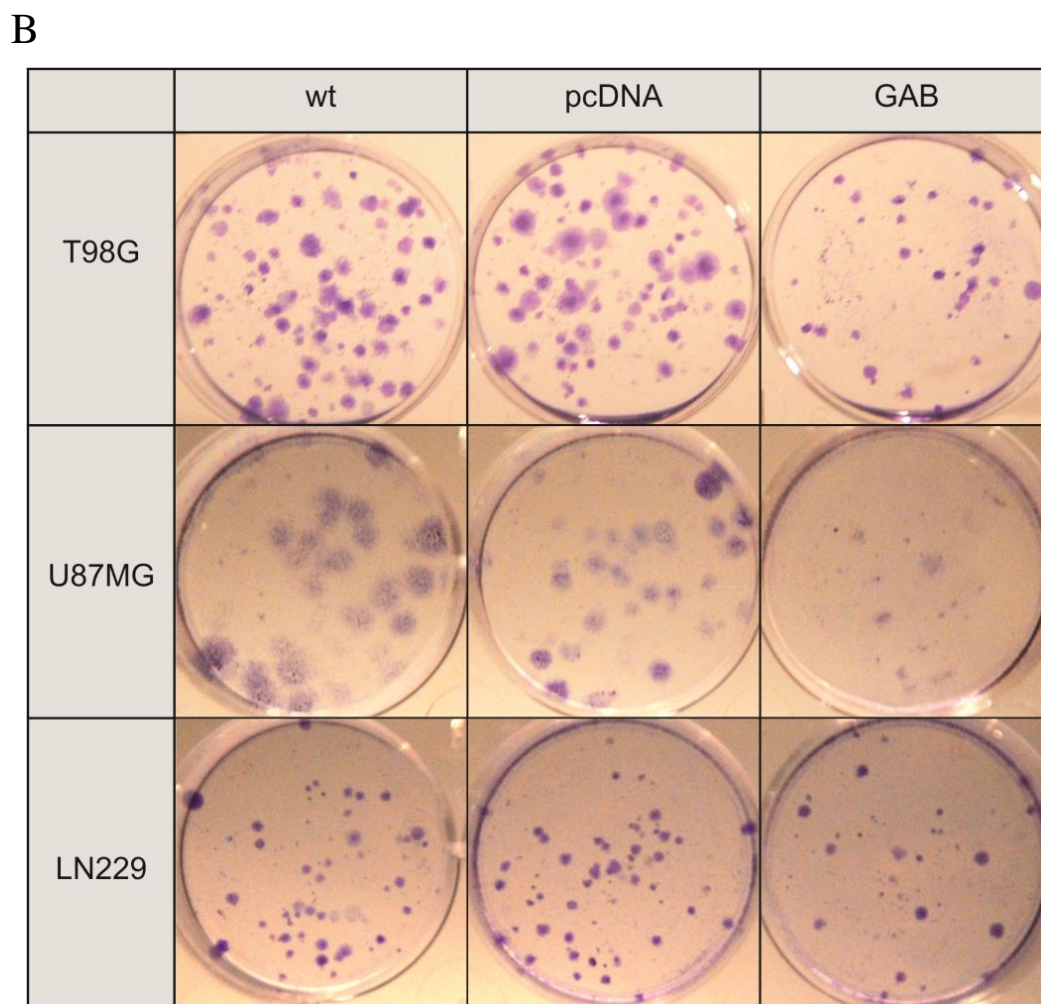
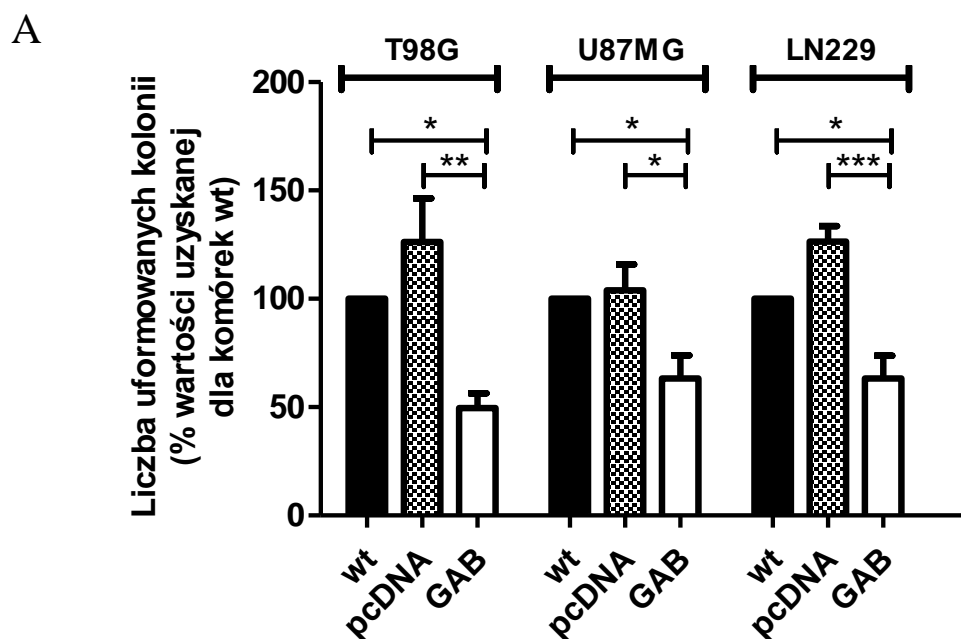
UpdDNA;  $**p < 0,01$  versus U87MG) w komórkach UGAB i 31% ( $**p < 0,01$ ) w komórkach LNGAB w porównaniu do linii kontrolnych (Ryc. V.3.).



**Ryc. V.3.** Wpływ transfekcji sekwencją kodującą GAB na proliferację komórek T98G, U87MG i LN229 analizowaną testem BrdU. Wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z 4 niezależnych doświadczeń wyrażoną jako procent wartości uzyskanej dla komórek dzikich (wt).  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$  versus komórki wt i pcDNA (One-way ANOVA z testem *post hoc* Tukey'a).

### V.2.3. Formowanie kolonii

Komórki linii T98G, U87MG i LN229 po transfekcji sekwencją kodującą GAB wykazały znamienne niższą zdolność do formowania kolonii w porównaniu do linii kontrolnych. Komórki TGAB tworzyły średnio o 50% ( $*p < 0,05$  versus T98G;  $**p < 0,01$  versus TpcDNA) mniej kolonii po trzech tygodniach hodowli w porównaniu z komórkami T98G i TpcDNA. Komórki U87GAB ( $*p < 0,05$ ) i LNGAB ( $*p < 0,05$  versus LN229;  $***p < 0,001$  versus LNpcDNA) formowały średnio o 37% mniej kolonii niż komórki dzikie i pcDNA (Ryc. V.4.).



**Ryc. V.4. Wpływ transfekcji sekwencją kodującą GAB na zdolność komórek T98G, U87MG i LN229 do formowania kolonii.** (A) Liczba kolonii uformowanych po 3 tygodniach hodowli. Wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z 4-7 niezależnych

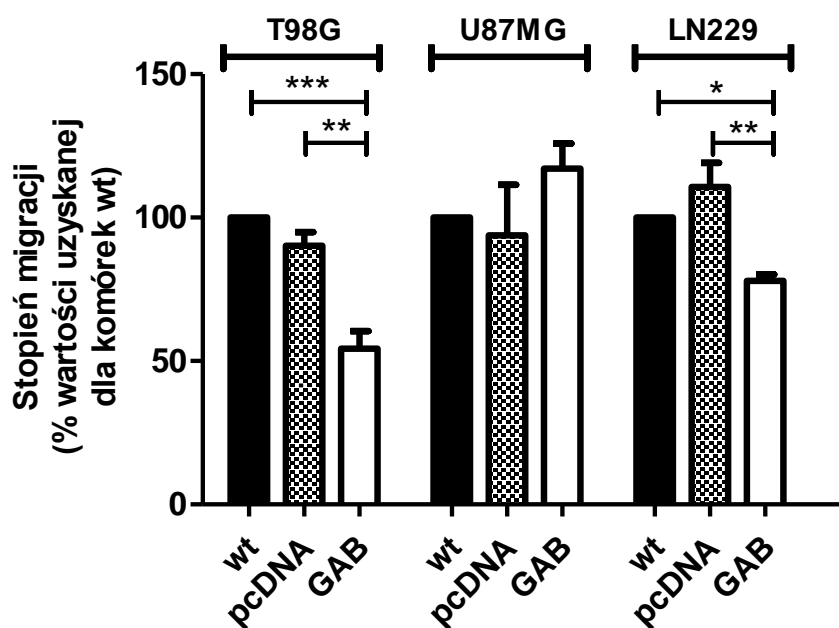


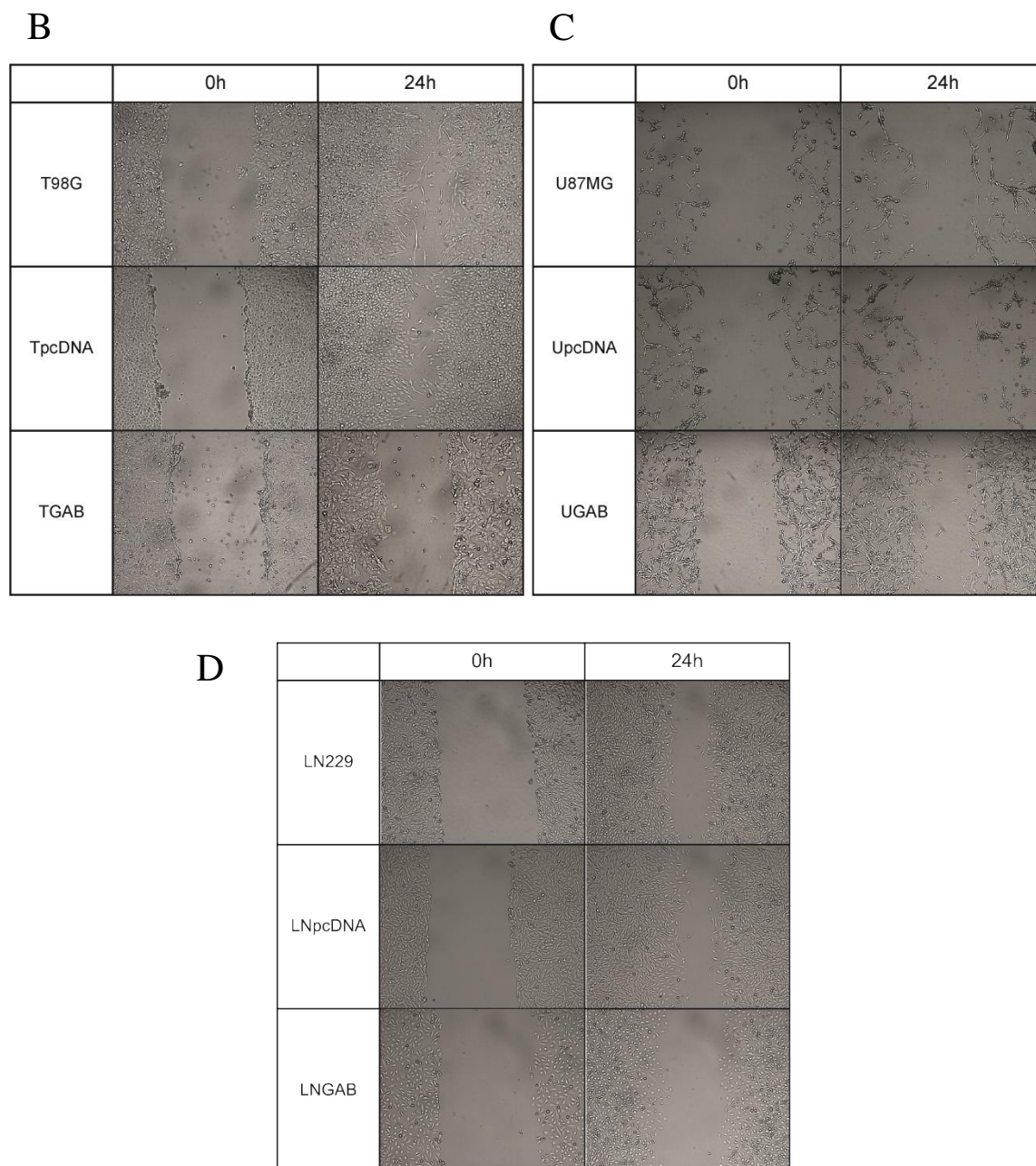
doświadczeń wyrażoną jako procent wartości uzyskanej dla komórek dzikich (wt). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  *versus* komórki wt i pcDNA (One-way ANOVA z testem *post hoc* Tukey'a). (B) Reprezentatywne zdjęcia płytek z wybarwionymi koloniami po 3 tygodniach hodowli.

#### V.2.4. Migracja komórek

Komórki TGAB oraz LNGAB wykazały znamienne obniżoną wartość określającą zdolność do migracji, odpowiednio o 46% (\*\* $p < 0,01$  *versus* TpcDNA; \*\*\* $p < 0,001$  *versus* T98G) i 22% (\* $p < 0,05$  *versus* LN229; \*\* $p < 0,01$  *versus* LNpcDNA) w porównaniu do linii kontrolnych. W przypadku linii UGAB nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w zdolności do migracji tych komórek (Ryc. V.5).

A

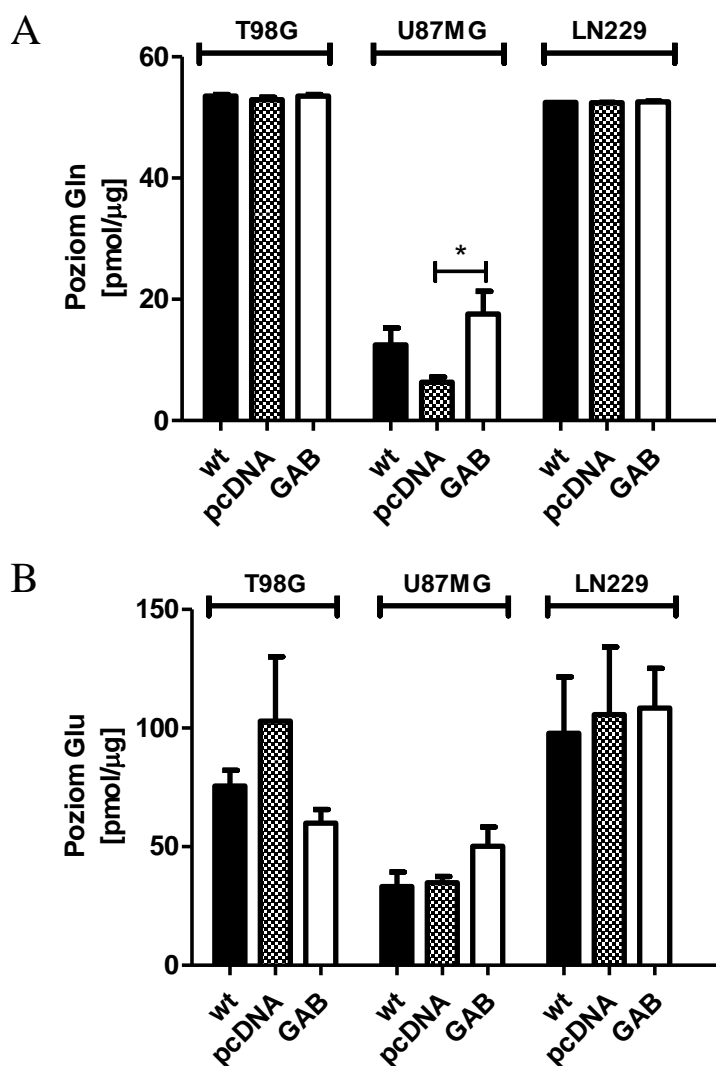




**Ryc. V.5. Wpływ transfekcji sekwencją kodującą GAB na zdolności migracyjne komórek T98G, U87MG i LN229.** (A) Migracja komórek. Wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z 3-5 niezależnych doświadczeń wyrażoną jako procent wartości uzyskanej dla komórek dzikich (wt). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  versus komórki wt i pcDNA (One-way ANOVA z testem *post hoc* Tukey'a). Reprezentatywne zdjęcia rysy wykonanej na konfluentnej hodowli komórek (B) T98G, (C) U87MG, (D) LN229 po 0 i 24 godzinach od jej wykonania.

### V.3. Wpływ transfekcji sekwencją kodującą GAB na wewnątrzkomórkowy poziom glutaminy i glutaminianu w komórkach linii glioblastoma

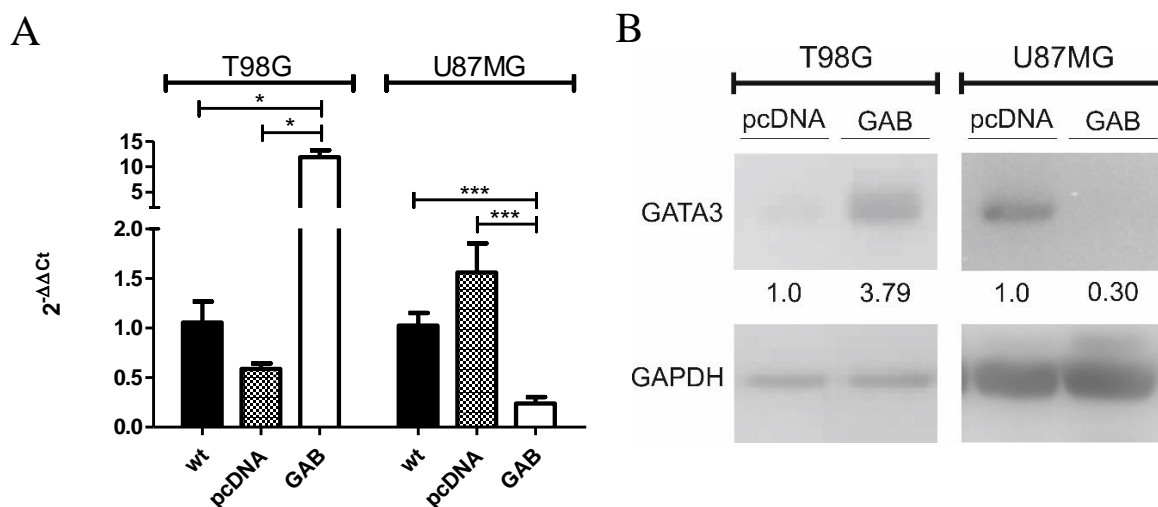
Nie wykazano zmian w wewnątrzkomórkowym stężeniu Gln i Glu w komórkach T98G i LN229 (Ryc. V.6. A i B) po transfekcji sekwencją kodującą GAB. W komórkach U87MG zaobserwowano istotny statystycznie wzrost ( $*p < 0,05$ ) stężenia Gln w porównaniu do komórek UpcDNA (Ryc. V.6. A) przy jednoczesnym braku zmian w wewnątrzkomórkowym stężeniu Glu w tych komórkach (Ryc. V.6. B).



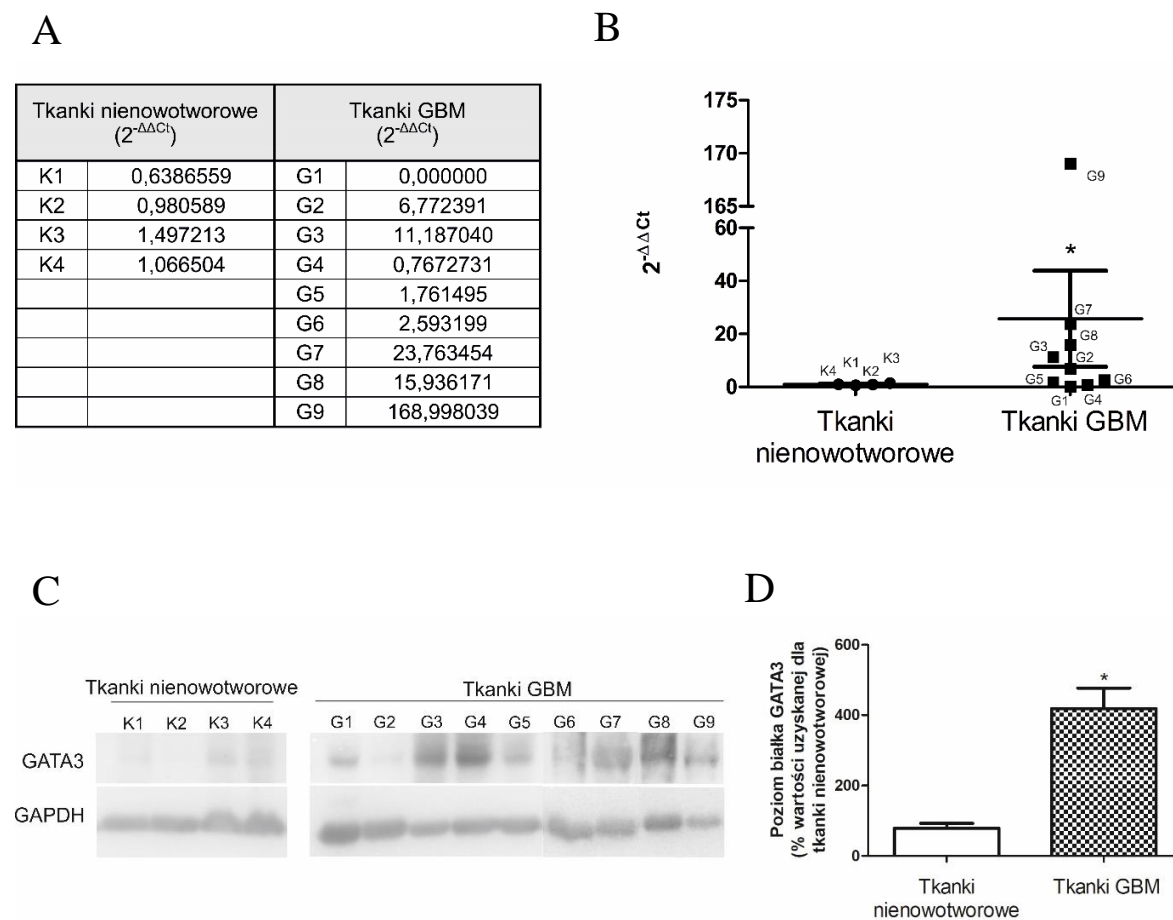
**Ryc. V.6. Wpływ transfekcji sekwencją kodującą GAB na wewnątrzkomórkowy poziom (A) Gln i (B) Glu w komórkach T98G, U87MG i LN229.** Wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z 3-5 niezależnych doświadczeń wyrażoną jako procent wartości uzyskanej dla komórek dzikich (wt).  $*p < 0,05$  versus komórki wt i pcDNA (One-way ANOVA z testem *post hoc* Tukey'a).

#### **V.4. Wpływ transfekcji sekwencją kodującą GAB na ekspresję genu i poziom białka GATA3 w liniach komórkowych T98G i U87MG oraz ekspresję genu i poziom białka GATA3 w GBM i tkankach kontrolnych**

Wykorzystując metodę Real-Time PCR potwierdzono wykazane we wcześniejszych badaniach metodą mikromacierzy (Szeliga i wsp., 2009) znaczne podwyższenie poziomu ekspresji genu *GATA3* w komórkach T98G po transfekcji GAB (\* $p < 0,05$ ) (Ryc. V.7. A) oraz wykazano podwyższoną ilość białka GATA3 w komórkach TGAB (\* $p < 0,05$ ) w porównaniu do kontroli pcDNA (Ryc. V.7. B). Obserwacje te sugerowały, że ekspresja *GATA3* może zależeć od ilości GAB, co stało się punktem wyjścia do zbadania poziomu GATA3 w materiale klinicznym od pacjentów z GBM. Jednakże w tkankach GBM, w których nie zidentyfikowano transkryptu GAB, zaobserwowano istotny statystycznie wzrost zarówno w poziomie ekspresji *GATA3* (\* $p < 0,05$ ) (Ryc. V.8. A i B), jak i poziomie białka GATA3 (\* $p < 0,05$ ) w porównaniu do tkanek nienowotworowych ekspresyjnie GAB (Ryc. V.8. C i D). W komórkach linii U87MG po transfekcji GAB zaobserwowano natomiast odwrotną zależność w stosunku do linii komórek T98G: stwierdzono obniżenie ekspresji genu (\*\* $p < 0,001$ ) oraz poziomu białka (\*\* $p < 0,001$ ) GATA3 w komórkach transfekowanych sekwencją GAB w stosunku do komórek kontrolnych (dzikich i pcDNA) (Ryc. V.7.).



**Ryc. V.7. Wpływ transfekcji sekwencją kodującą GAB na ekspresję genu i poziom białka GATA3 w komórkach T98G i U87MG.** (A) Ekspresja genu *GATA3* w komórkach linii T98G i U87MG mierzona względem *ACTβ*. Wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z 4 niezależnych doświadczeń. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  versus komórki wt i pcDNA (One-way ANOVA z testem post hoc Tukey'a). (B) Poziom białka GATA3 w komórkach linii komórkowych T98G i U87MG mierzony względem GAPDH. Wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z 3-5 niezależnych doświadczeń. Wartości podane pod typowym obrazem immunodetekcji określają stosunek średniej intensywności sygnału prążka badanego białka do białka GAPDH. Stosunek wartości uzyskanej dla komórek pcDNA przyjęto jako 1.

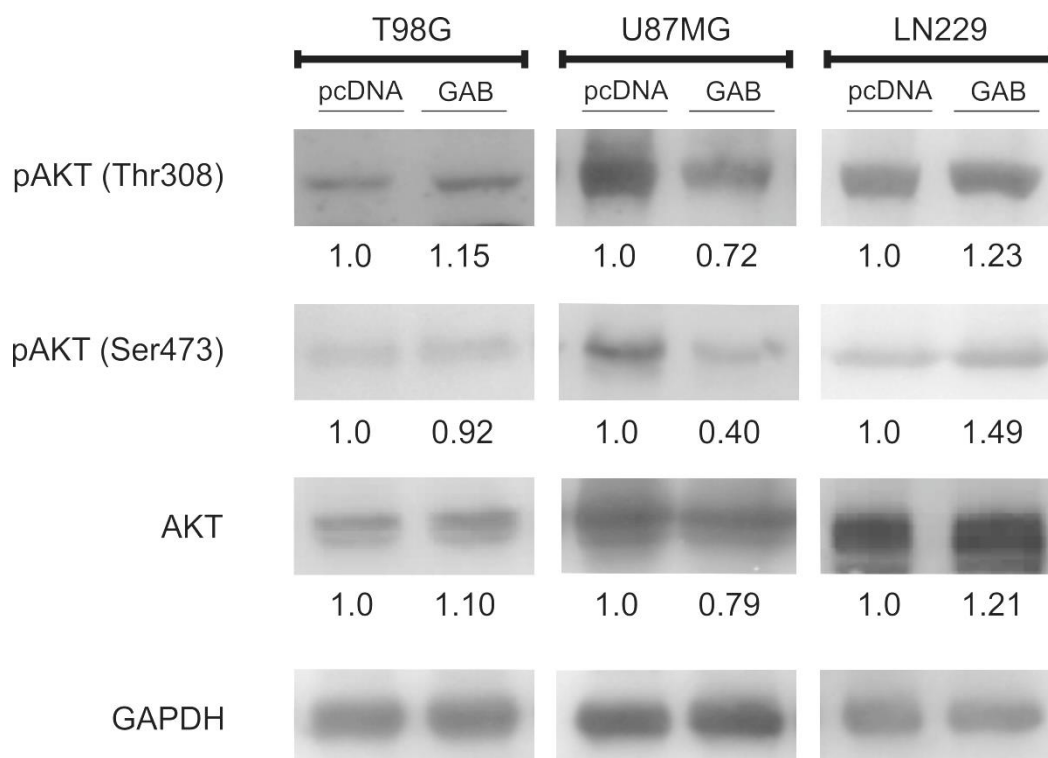


**Ryc. V.8. Ekspresja genu i poziom białka GATA3 w GBM i tkankach kontrolnych.**

(A) Wartości  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  *GATA3* mierzone względem *ACTβ*. (B) Ekspresja mRNA kodującego *GATA3*. Wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z 4-9 tkanek. \* $p < 0.05$  versus tkanki nienowotworowe (test t-Studenta). (C) Typowy obraz immunodetekcji. (D) Poziom *GATA3* mierzony względem *GAPDH*. Wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z 4-9 tkanek. \* $p < 0.05$  versus komórki nienowotworowe (test t-Studenta).

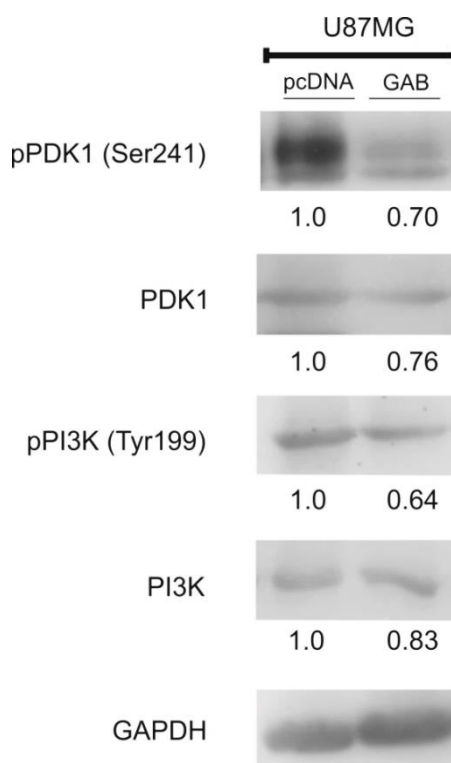
## **V.5. Wpływ transfekcji sekwencją kodującą GAB na poziom wybranych białek należących do szlaku AKT w komórkach linii glioblastoma**

Przeprowadzone badania nie wykazały istotnych statystycznie zmian w fosforylacji AKT na Thr308 i Ser473 pomiędzy komórkami TpcDNA i TGAB oraz LNpcDNA i LNGAB, przy czym w komórkach LN229 po transfekcji sekwencją GAB zaobserwowano tendencję wzrostową w poziomie ufosforylowania AKT na Ser473. Istotne statystycznie obniżenie stopnia ufosforylowania na Thr308 (\*\* $p < 0,01$ ) i Ser473 (\*\* $p < 0,01$ ) stwierdzono w komórkach UGAB w porównaniu do komórek UpcDNA (Ryc. V.9.). W komórkach UGAB w porównaniu do komórek UpcDNA zaobserwowano tendencję w kierunku zmniejszenia ilości białka całkowitego AKT. Analiza densytometryczna nie wykazała znamienych zmian w poziomie białka całkowitego w żadnej z wybranych linii GBM po transfekcji sekwencją GAB w porównaniu do komórek pcDNA. Przez wzgląd na zmiany zaobserwowane pod wpływem transfekcji w komórkach linii U87MG, w dalszej części badań przeanalizowano poziom białek odpowiadających za fosforylowanie AKT na Thr308, t.j. PDK1 oraz PI3K w komórkach tej linii. Analiza wykazała istotne statystycznie obniżenie zarówno poziomu ufosforylowania PDK1 na Ser241 ( $p < 0,05$ ), jak i białka całkowitego PDK1 ( $p < 0,05$ ) w komórkach UGAB w porównaniu do komórek UpcDNA. Ponadto, transfekcja sekwencją GAB komórek U87MG obniżyła poziom ufosforylowania PI3K na Tyr199 ( $p < 0,05$ ) przy braku istotnych statystycznie zmian w poziomie białka całkowitego PI3K (widoczna była jedynie tendencja w kierunku obniżenia ilości białka całkowitego PI3K) (Ryc. V.10.).



**Ryc. V.9. Poziom fosforylacji oraz białka całkowitego AKT w komórkach T98G, U87MG i LN229 po transfekcji sekwencją kodującą GAB.** Poziom fosforylacji na Thr308 i Ser473 oraz białka całkowitego AKT mierzony względem GAPDH. Wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z 4-6 niezależnych doświadczeń. Wartości podane pod typowym obrazem immunodetekcji określają stosunek średniej intensywności sygnału prążka badanego białka do białka GAPDH. Stosunek wartości uzyskanej dla komórek pcDNA przyjęto jako 1.



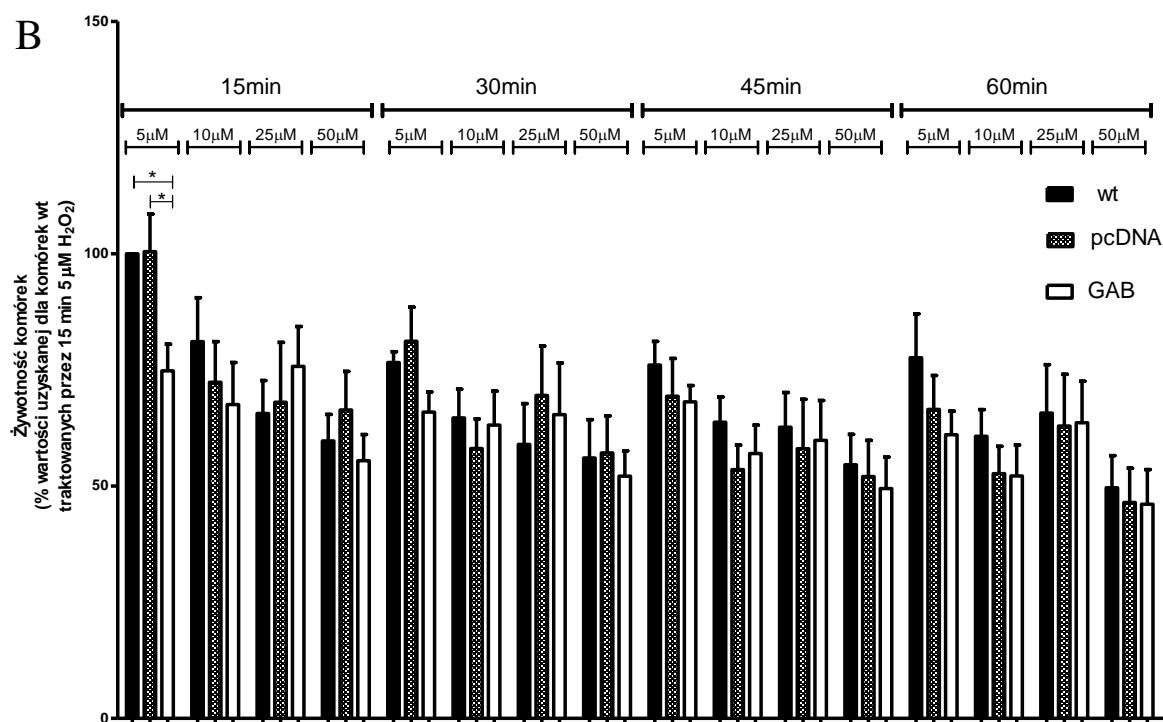
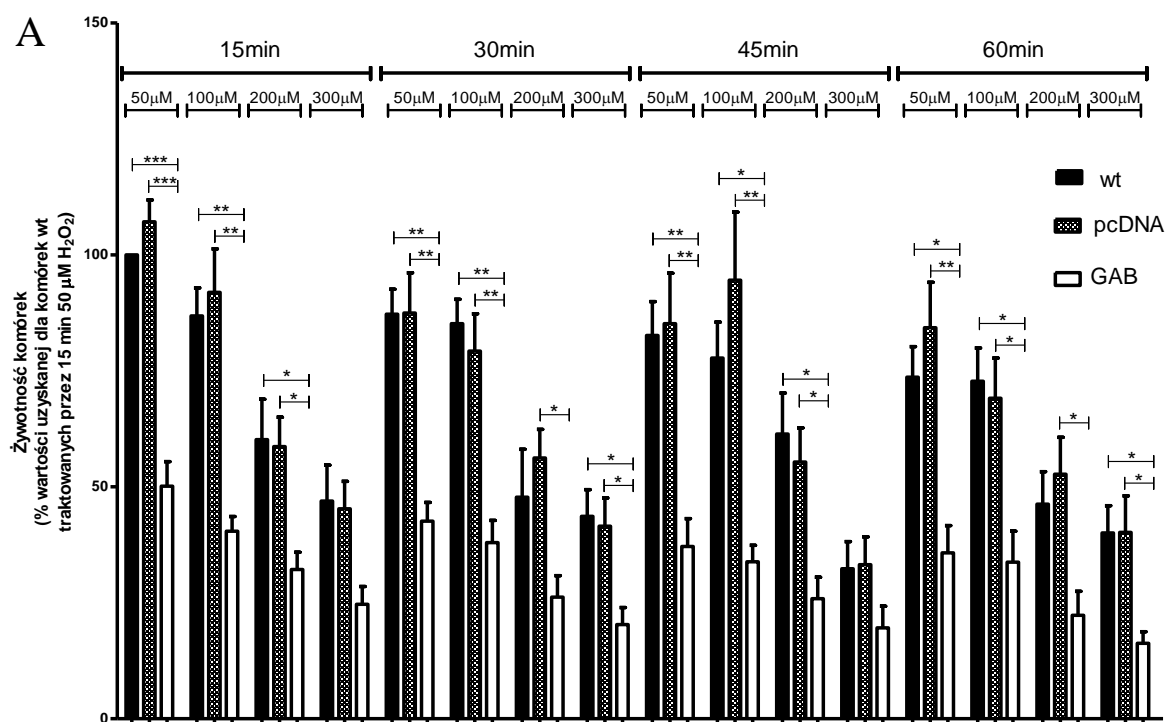


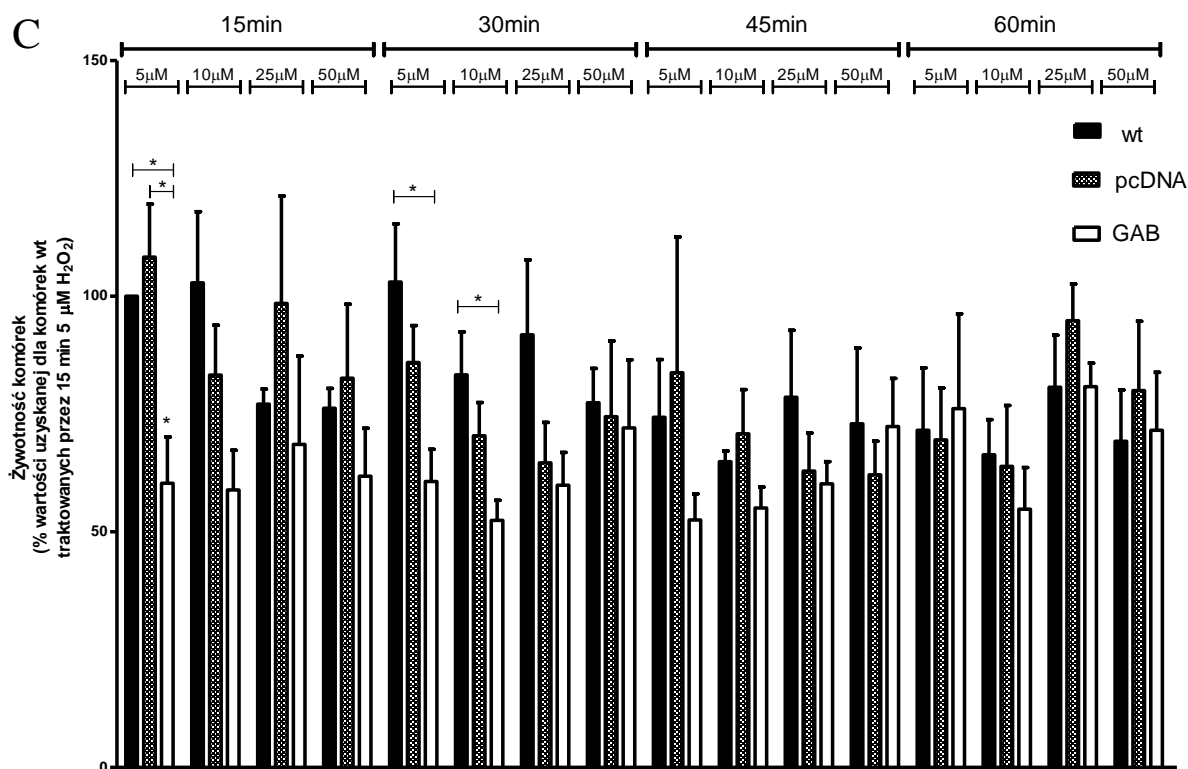
**Ryc. V.10. Poziom fosforylacji oraz białka całkowitego PDK1 i PI3K w komórkach U87MG po transfekcji sekwencją kodującą GAB.** Poziom białka fosforylowanego oraz białka całkowitego mierzony względem GAPDH. Wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z 4 niezależnych doświadczeń. Wartości podane pod typowym obrazem immunodetekcji określają stosunek średniej intensywności sygnału prążka badanego białka do białka GAPDH. Stosunek wartości uzyskanej dla komórek pcDNA przyjęto jako 1.

#### **V.6. Wpływ transfekcji sekwencją kodującą GAB na wrażliwość komórek wybranych linii glioblastoma ludzkiego na działanie nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ )**

Zaobserwowano zmniejszoną żywotność komórek TGAB (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ) w porównaniu do kontroli w obecności  $H_2O_2$  w stężeniach 50, 100, 200  $\mu$ M po 15, 30, 45 i 60 minutach oraz w stężeniu 300  $\mu$ M po 30 i 60 minutach traktowania komórek (Ryc. V. 11. A). Linie komórek U87MG i LN229 charakteryzowały się większą wrażliwością na działanie  $H_2O_2$  w porównaniu do komórek T98G, dlatego zastosowano niższe stężenia  $H_2O_2$  (5, 10, 25, 50  $\mu$ M). Istotnie statystycznie obniżenie żywotności komórek UGAB (\* $p < 0,05$ ) i LNGAB (\* $p < 0,05$ ) w porównaniu do komórek kontrolnych

(wt i pcDNA) zaobserwowano przy 15 minutach traktowania 5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (Ryc. V. 11. B i C).





**Ryc. V.11. Wpływ transfekcji sekwencją kodującą GAB na żywotność komórek linii GBM traktowanych H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Żywotność komórek (A) T98G, (B) U87MG, (C) LN229 była mierzona testem MTT po traktowaniu wybranymi stężeniami H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> przez 15, 30, 45 lub 60 minut. Wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z 3-5 niezależnych doświadczeń wyrażoną jako procent wartości uzyskanej dla komórek dzikich (wt) traktowanych najniższym stosowanym stężeniem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> przez 15 minut. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  versus komórki wt i pcDNA (One-way ANOVA z testem *post hoc* Tukey'a).

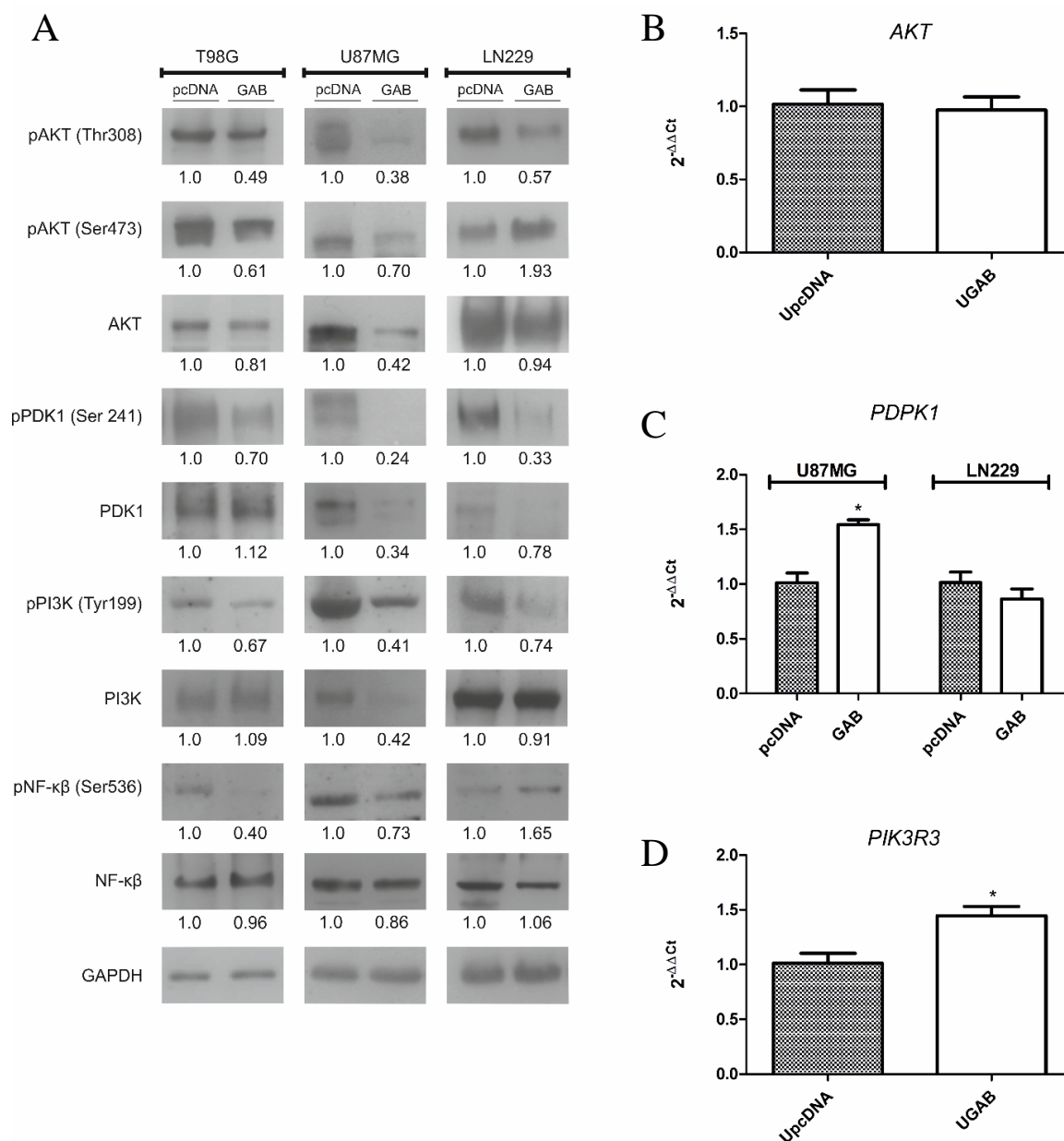
## V.7. Wpływ transfekcji sekwencją kodującą GAB na wybrane elementy szlaku sygnałowego AKT w komórkach linii glioblastoma ludzkiego traktowanych nadtlakiem wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

### V.7.1 Poziom wybranych białek szlaku sygnałowego AKT w komórkach traktowanych H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

W celu sprawdzenia hipotezy zakładającej, że za uwrażliwienie komórek GBM na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> odpowiadają zmiany w poziomie aktywności ścieżki AKT zbadano wpływ transfekcji sekwencją GAB w komórkach linii GBM na poziom białek należących do tej

ścieżki w warunkach, w których komórki GAB wykazywały mniejszą żywotność w porównaniu do kontroli. Czas traktowania i stężenia H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zostały dobrane na podstawie wyników badań opisanych w rozdziale V.6 (Ryc. V.11.). We wszystkich liniach transfekowanych GAB zaobserwowano obniżony poziom fosforylacji AKT na Thr308 (\*p<0,05) w porównaniu z komórkami kontrolnymi pcDNA. Komórki TGAB (\*p<0,05) i UGAB (\*\*p<0,01) wykazały także obniżony poziom fosforylacji AKT na Ser473, w przeciwieństwie do komórek LNGAB, w których zaobserwowano wzrost poziomu ufosforylowania AKT na Ser473 (\*p<0,05). W komórkach UGAB wykazano obniżenie poziomu białka całkowitego AKT (\*p<0,05) w porównaniu do komórek pcDNA. Nie zaobserwowano jednak zmian w poziomie białka całkowitego AKT pomiędzy liniami TGAB i TpcDNA oraz LNGAB i LNpcDNA. Poziom białek zaangażowanych w fosforylację AKT na Thr308, pPDK1 (dla TGAB i UGAB \*p<0,05; dla LNGAB \*\*\*p<0,001) oraz pPI3K (\*\*p<0,01) był obniżony we wszystkich liniach transfekowanych GAB w porównaniu do ich kontroli pcDNA. Poziom białka całkowitego PDK1 był obniżony w komórkach UGAB (\*\*p<0,01) i LNGAB (\*p<0,05), podczas gdy poziom białka całkowitego PI3K ulegał obniżeniu jedynie w komórkach UGAB (\*p<0,05) w porównaniu do komórek kontrolnych pcDNA. Ponadto, w komórkach TGAB (\*\*p<0,01) i UGAB (\*p<0,05) w porównaniu do kontroli zaobserwowano obniżony poziom fosforylacji NF-κβ na Ser 536 przy braku zmian w poziomie białka całkowitego (Ryc. V.12. A).

Ze względu na stwierdzone zmiany poziomu białka całkowitego PDK1, PI3K i AKT w komórkach linii U87MG oraz PDK1 w komórkach linii LN229 zbadano poziom ekspresji genów kodujących te białka w warunkach działania na komórki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Analiza wykazała brak zmian w poziomie ekspresji genu *AKT* w komórkach UGAB i UpcDNA poddanych działaniu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ryc. V.12. B). Nie stwierdzono zmian w poziomie transkryptu *PDK1* pomiędzy liniami LNGAB i LNpcDNA, jednakże w komórkach UGAB zaobserwowano wzrost (\*p<0,05) poziomu mRNA w porównaniu z komórkami UpcDNA (Ryc. V.12. C). Ponadto komórki UGAB wykazały wyższy poziom (\*p<0,05) transkryptu *PI3K* w porównaniu z komórkami UpcDNA (Ryc. V.12. D).

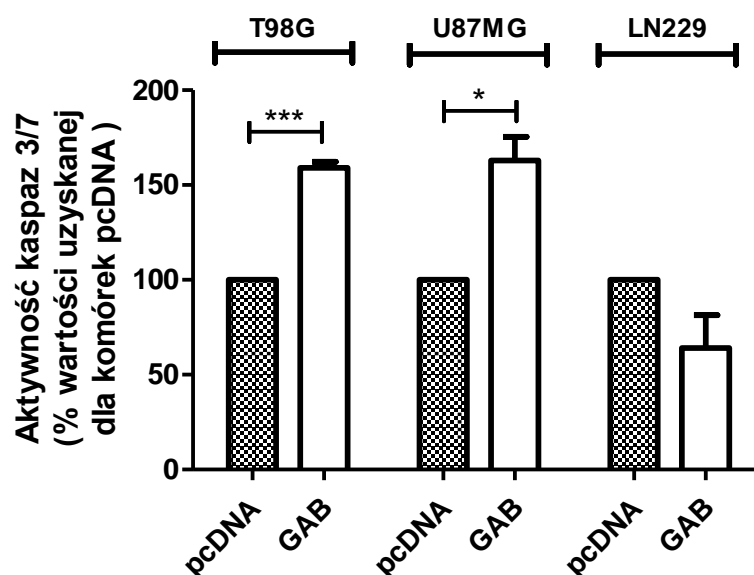


**Ryc. V. 12. Wpływ transfekcji sekwencją kodującą GAB na poziom białek należących do szlaku sygnałowego AKT w komórkach traktowanych  $H_2O_2$ .** (A) Poziom białek analizowany metodą WB w komórkach i) TpcDNA i TGAB traktowanych  $300 \mu M H_2O_2$  przez 60 minut; ii) UpcDNA i UGAB traktowanych  $5 \mu M H_2O_2$  przez 15 minut; iii) LNpcDNA i LNGAB traktowanych  $5 \mu M H_2O_2$  przez 15 minut. Wyniki są średnią ( $\pm SD$ ) uzyskaną z 3-6 niezależnych doświadczeń wyrażoną jako procent intensywności prążka zaobserwowany w komórkach pcDNA. Wartości podane pod typowym obrazem immunodetekcji określają stosunek średniej intensywności sygnału prążka badanego białka do białka GAPDH. Stosunek wartości uzyskanej dla komórek pcDNA przyjęto jako 1. (B) Poziom ekspresji genu *AKT*, kodującego AKT,

w komórkach UGAB i UpcDNA. Wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z 4 niezależnych doświadczeń. (C) Poziom ekspresji genu *PDPK1*, kodującego PDK1, w komórkach UGAB i UpcDNA oraz LNGAB i LNpcDNA. Wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z 4 niezależnych doświadczeń. (D) Poziom ekspresji genu *PIK3R3*, kodującego PI3K, w komórkach UGAB i UpcDNA. Wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z 4 niezależnych doświadczeń. Wartości  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  badanych mRNA mierzone względem poziomu transkryptu *ACTβ*. \* $p < 0.05$  versus komórki pcDNA (test t-Studenta).

### V.7.2 Aktywność kaspaz 3/7 w warunkach stosowania $H_2O_2$

Na podstawie obniżonego poziomu fosforylacji NF- $\kappa$ B (Ser536) zaobserwowanego w komórkach TGAB i UGAB postawiono hipotezę, że apoptoza odgrywa znaczącą rolę w śmierci tych komórek. W celu potwierdzenia tej hipotezy zbadano poziom aktywności kaspaz 3/7 w komórkach traktowanych  $H_2O_2$ . Komórki TGAB (\*\* $p < 0.001$ ) i UGAB (\* $p < 0.05$ ) traktowane  $H_2O_2$  wykazywały większą aktywność kaspaz 3/7 w porównaniu do odpowiednich kontroli pcDNA (Ryc. V. 13). Nie stwierdzono zmian w aktywności kaspaz 3/7 pomiędzy komórkami LNGAB i LNpcDNA (Ryc. V. 13.).



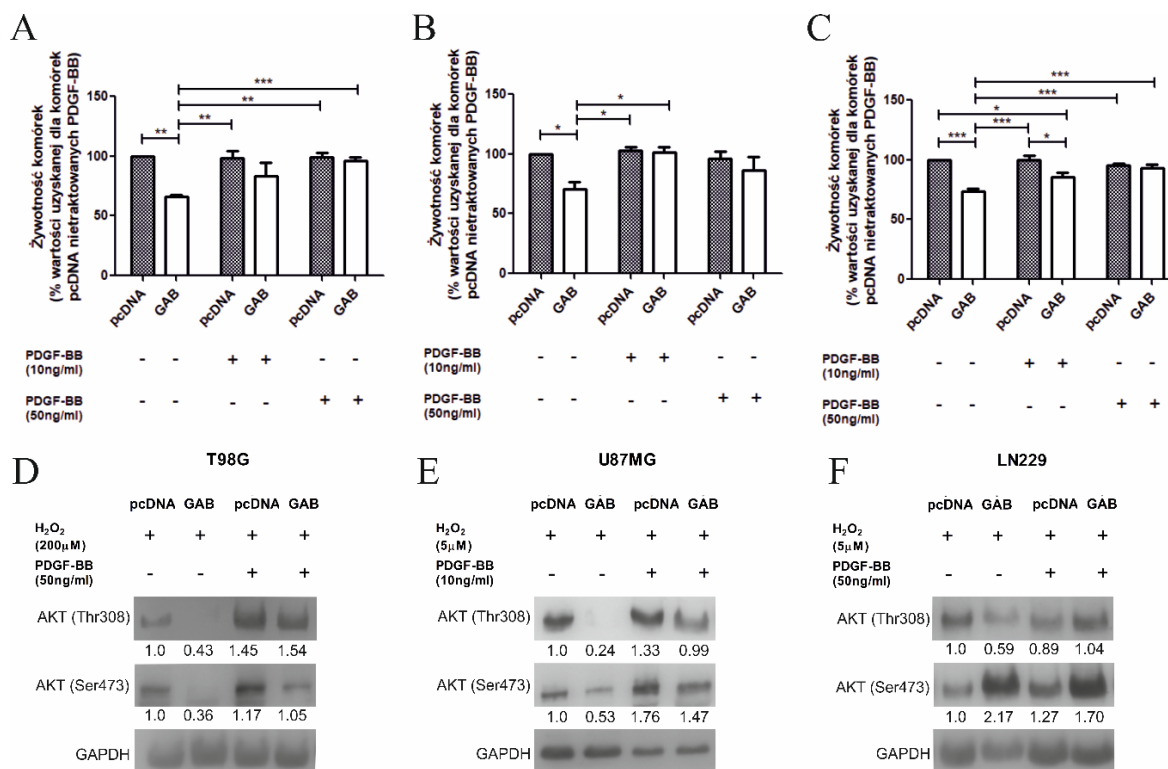
**Ryc. V.13. Wpływ transfekcji sekwencją kodującą GAB na aktywność kaspaz 3/7 w komórkach linii GBM traktowanych  $H_2O_2$ .** Analiza aktywności kaspaz 3/7 w komórkach: i) TpcDNA i TGAB traktowanych  $200 \mu M H_2O_2$  przez 15 minut;

ii) UpcDNA i UGAB traktowanych 5  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> przez 15 minut; iii) LNpcDNA i LNGAB traktowanych 5  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> przez 15 minut. Wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z 3-4 niezależnych doświadczeń wyrażoną jako procent aktywności kaspaz 3/7 zaobserwowanej w komórkach pcDNA. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  *versus* komórki pcDNA (test t-Studenta).

### V.7.3. Rola obniżonej aktywności szlaku AKT w uwrażliwieniu komórek linii glioblastoma transfekowanych sekwencją GAB na działanie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Wcześniejsze traktowanie komórek PDGF-BB, aktywatorem fosforylacji AKT (Rauch i wsp., 2000), obniżało wrażliwość komórek transfekowanych GAB na działanie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Zaobserwowano wzrost żywotności komórek TGAB z 66% do 96% (\*\*\* $p < 0,001$ ) (stężenie PDGF-BB 50 ng/ml) (Ryc.V.14. A), UGAB z 70% do 101% (\* $p < 0,05$ ) (stężenie PDGF-BB 10 ng/ml) (Ryc.V.14. B) oraz LN229 z 74% do 94% (\*\*\* $p < 0,001$ ) (stężenie PDGF-BB 50 ng/ml) (Ryc.V.14. C). Jednocześnie stwierdzono, że preinkubacja komórek z PDGF-BB nie wpływała na żywotność komórek pcDNA poddanych działaniu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ryc. V.14. A-C).

Analiza fosforylacji AKT potwierdziła, że stosowanie PDGF-BB podnosi poziom fosforylacji na Thr308 w komórkach wszystkich linii GAB (dla UGAB \* $p < 0,05$ ; dla LNGAB \*\* $p < 0,01$ ; dla TGAB \*\*\* $p < 0,001$ ) poddanych działaniu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w porównaniu do komórek transfekowanych GAB, którym nie podano PDGF-BB (Ryc. V.14. D-F). Preinkubacja z PDGF-BB nie wpłynęła na stopień fosforylacji AKT na Thr308 w komórkach pcDNA poddanych działaniu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ryc. V.14. D-F). Ponadto, stosowanie PDGF-BB podwyższyło poziom fosforylacji AKT na Ser473 w komórkach TGAB (\* $p < 0,05$ ) poddanych działaniu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, czego nie zaobserwowano w komórkach TpcDNA (Ryc. V.14. D). W komórkach UGAB i UpcDNA zaobserwowano podobną tendencję jak w komórkach TGAB i TpcDNA (Ryc. V.14. E). Poziom fosforylacji AKT na Ser473 w komórkach LNGAB inkubowanych z (\*\* $p < 0,01$ ) lub bez (\*\*\* $p < 0,001$ ) PDGF-BB był wyższy od poziomu obserwowanego w komórkach LNpcDNA (Ryc. V.14. F).



**Ryc. V.14. Wpływ inkubacji z PDGF-BB, aktywatorem szlaku AKT, na wrażliwość komórek na działanie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** (A) Żywotność komórek TGAB i TpcDNA inkubowanych bez lub z PDGF-BB (10 ng/ml i 50 ng/ml) przez 24 godziny przed ekspozycją na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 μM, 15 minut) (B) Żywotność komórek UGAB i UpcDNA inkubowanych bez lub z PDGF-BB (10 ng/ml i 50 ng/ml) przez 24 godziny przed ekspozycją na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 μM, 15 minut) (C) Żywotność komórek LNGAB i LNcDNA inkubowanych bez lub z PDGF-BB (10 ng/ml i 50 ng/ml) przez 24 godziny przed ekspozycją na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 μM, 15 minut). Wyniki są średnią (±SD) uzyskaną z 4-5 niezależnych doświadczeń wyrażoną jako procent wartości uzyskanej dla komórek pcDNA inkubowanych bez PDGF-BB. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*<p0.001 *versus* komórki pcDNA inkubowane bez PDGF-BB (One-way ANOVA z testem *post hoc* Tukey'a). Wpływ inkubacji z PDGF-BB na poziom fosforylacji AKT na Thr308 i Ser473 w komórkach linii (D) TGAB i TpcDNA (E) UGAB i UpcDNA (F) LNGAB i LNpcDNA w komórkach traktowanych H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Wyniki są średnią (±SD) uzyskaną z 3-4 niezależnych doświadczeń. Wartości podane pod typowym obrazem immunodetekcji określają stosunek średniej intensywności sygnału prążka badanego białka do białka GAPDH. Stosunek wartości uzyskanej dla komórek pcDNA przyjęto jako 1.



## VI. DYSKUSJA

Gln i Glu odgrywają kluczową rolę w procesie nowotworzenia oraz kształtowaniu fenotypu GBM. Gln stanowi jedno z głównych źródeł energii oraz azotu wykorzystywanych w procesie proliferacji. Ponadto aminokwas ten jest czynnikiem zaangażowanym w regulację objętości komórek GBM (Michalak i wsp., 2015; Ernest i Sontheimer, 2007). Glu wydzielany w dużych ilościach przez komórki nowotworowe działa ekscytotoksycznie powodując obumieranie sąsiadujących z guzem neuronów, dzięki czemu umożliwia rozrost tkanki nowotworowej. Glu jest prekursorem GSH, czynnika w dużej mierze odpowiedzialnego za oporność GBM na radio- i chemioterapię (de Groot i Sontheimer, 2010; Ye i Sontheimer, 1999). Z tych względów GA, enzym metabolizujący Gln do Glu, stała się przedmiotem intensywnych badań związanych z tematyką GBM.

Zaburzenia aktywności i/lub ekspresji różnych izoform GA są cechą charakterystyczną komórek nowotworowych o różnej histogenezie (Szeliga i Obara-Michlewska, 2009). Dane literaturowe wskazują na przeciwstawną funkcję izoform GA w kształtowaniu fenotypu różnych nowotworów. Izoformy GA nerkowej są charakterystyczne dla komórek intensywnie proliferujących, podczas gdy izoformy GAB wątrobowej ulegają ekspresji w komórkach o niskim indeksie proliferacji (Pérez-Gómez i wsp., 2005; Turner i McGivan, 2003). GBM wykazuje śladową ilość lub całkowity brak GAB, przy jednoczesnym wysokim poziomie izoformy nerkowej GA (GAC i KGA) (Szeliga i wsp., 2005). Dotychczasowe badania wskazują, że zarówno wyciszenie ekspresji genu *GLS* (Martín-Rufián i wsp., 2014; Szeliga i wsp., 2014), jak i indukcja ekspresji genu *GLS2* (Szeliga i wsp., 2009, Szeliga i wsp., 2014; Martín-Rufián i wsp., 2014) hamują przeżywalność, proliferację i zdolności migracyjnie komórek GBM linii T98G.

### VI.1. Wpływ GAB na własności biologiczne komórek glioblastoma

Dane literaturowe dotyczące wpływu transfekcji sekwencją GAB na własności biologiczne komórek linii T98G stały się punktem wyjścia do kolejnych badań. Pierwszym celem niniejszej pracy było zweryfikowanie hipotezy zakładającej, że

egzogenna GAB wywoła podobny efekt w komórkach różnych linii GBM. Wykorzystane w badaniach komórki linii U87MG i LN229 różnią się między sobą, ale także w stosunku do komórek linii T98G, zdolnościami do formowania nowotworów *in vivo* (ang. *tumorigenic potential*) oraz statusem genów kodujących białka odgrywające istotną rolę w kształtowaniu fenotypu GBM: *TP53*, *PTEN* i *MGMT* (Ishii i wsp., 1999; Lan i wsp., 2016; Dunn i wsp., 2009; Perazzoli i wsp., 2015; Gaspar i wsp., 2010). Wyniki prezentowane w niniejszej rozprawie wskazują, że transfekcja zarówno komórek T98G, jak i U87MG oraz LN229 (pierwotnie nie ekspresujących GAB) sekwencją kodującą GAB znamienne obniża ich żywotność, potencjał proliferacyjny, a także zdolność do formowania kolonii (Ryc. V.2-4). Występowanie opisanych zmian w komórkach wszystkich badanych linii oznacza, że GAB hamuje przeżywalność i proliferację komórek GBM niezależnie od ich statusu *TP53*, *PTEN* i *MGMT* oraz zdolności do formowania nowotworów *in vivo*. Przeprowadzone badania wskazują na rozbieżność we wpływie transfekcji sekwencją kodującą GAB na komórki linii GBM w odniesieniu do ich zdolności do migracji. Obniżenie zdolności do migracji zaobserwowano w komórkach TGAB i LNGAB w porównaniu z komórkami kontrolnymi pcDNA i wt, nie stwierdzono jednak zmian w tym parametrze w przypadku komórek UGAB w porównaniu do kontroli (Ryc. V. 5). Przyczyny występowania tej rozbieżności pozostają niejasne. Warto jednak nadmienić, że Ramão i wsp. wykazali, że komórki U87MG mają wyższą zdolność migracji w porównaniu zarówno z komórkami T98G (Ramão i wsp., 2012) jak z komórkami LN229 (Esencay i wsp., 2013). Tak więc, komórki U87MG wydają się mieć znacznie większy potencjał do migracji w porównaniu z komórkami T98G i LN229. Możliwe zatem, że transfekcja sekwencją GAB nie uruchamia w komórkach U87MG mechanizmu efektywnie hamującego zdolności migracyjne. Innym wytłumaczeniem obserwowanego zjawiska jest istnienie w tych komórkach elementu znoszącego hamujący efekt działania GAB na zdolności do migracji.

## VI.2. Poziom glutaminy i glutaminianu w komórkach po transfekcji GAB

GA jest enzymem hydrolizującym Gln do Glu i jonów amonowych (Matés i wsp., 2013), zatem aktywna enzymatycznie GA powinna zmieniać stężenie Gln i Glu w komórce. Przedstawione w niniejszej rozprawie wyniki wykazały brak zmian w wewnątrzkomórkowym stężeniu Gln w komórkach T98G i LN229 i wzrost stężenia

tego aminokwasu w komórkach U87MG po transfekcji sekwencją kodującą GAB. Zaobserwowano również brak zmian w stężeniu Glu w komórkach wszystkich linii GBM (Ryc. V.6.). Wyniki uzyskane w niniejszej rozprawie sugerują, że w transfektantach będących modelem badawczym w tej pracy, GAB nie jest aktywna enzymatycznie. W takim przypadku zmiany we własnościach biologicznych komórek transfekowanych GAB wynikałyby z innych niż enzymatyczna funkcji GAB. Nie można jednak wykluczyć, że GAB jest aktywna enzymatycznie, jednak poza tą funkcją moduluje również - bezpośrednio bądź pośrednio - ekspresję genów, w tym ekspresję *GLS*. Takie działanie powodowałoby obniżenie aktywności powstających z genu *GLS* izoform i w efekcie końcowym prowadziłoby do braku zmian w wewnątrzkomórkowym stężeniu Gln. W regulację poziomu ekspresji genu *GLS* zaangażowane są miRNA (miR-23), które podlegają modulacji przez onkogen c-Myc (Gao i wsp., 2009). Jednym z genów, którego poziom ekspresji ulegał podwyższeniu w komórkach T98G po transfekcji sekwencją kodującą GAB w porównaniu do komórek kontrolnych był gen *MAX* (ang. *MYC associated factor X*) (Szeliga i wsp., 2009). Kodowane przez ten gen białko dimeryzuje z c-Myc wpływając na jego aktywność, co w dalszej konsekwencji może mieć wpływ na poziom ekspresji *GLS* (Cascón i Robledo, 2012).

Wcześniejsze badania prowadzone w Zakładzie Neurotoksykologii IMDiK PAN wykazały zmiany w stężeniu Gln i Glu w komórkach T98G transfekowanych sekwencją GAB (Szeliga i wsp., 2009). Przyczyny rozbieżności pomiędzy danymi literaturowymi a wynikami przedstawionymi w niniejszej rozprawie są trudne do wyjaśnienia. Należy zaznaczyć, że wykorzystywane w tej pracy komórki T98G nie pochodziły z tej samej puli co komórki będące modelem we wcześniejszych badaniach, a komórki TpcDNA i TGAB zostały uzyskane na drodze nowej transfekcji. Zmienność komórek postępująca wraz z kolejnymi pasażami została udokumentowana w różnych liniach komórkowych, w tym w liniach GBM (Zeng i wsp., 2018). Trudno określić, czy – a jeśli tak, to w jaki sposób - podobne zjawisko mogło spowodować, że pomimo transfekcji tym samym plazmidem niosącym sekwencję kodującą GAB, komórki wykazały zmiany lub ich brak w poziomie Gln i Glu.

### VI.3. Poziom GAB i GATA3 w komórkach glioblastoma

Wcześniejsze badania prowadzone w Zakładzie Neurotoksykologii IMDiK PAN wykazały wpływ GAB na profil ekspresji licznych genów (Szeliga i wsp., 2009). Jednym z genów, których poziom ekspresji w komórkach T98G po transfekcji sekwencją GAB ulegał podwyższeniu jest gen *GATA3* (Szeliga i wsp., 2009). We *Wstępie* (podrozdział II.6.1) zwrócono uwagę na plejotropową rolę *GATA3* w progresji nowotworów o różnej etiologii. W niniejszej pracy potwierdzono znacznie podwyższoną ekspresję genu *GATA3* (Ryc. V.8.) oraz wykazano podwyższony poziom białka *GATA3* w komórkach TGAB w porównaniu do komórek kontrolnych TpcDNA (Ryc. V.7.). Zaobserwowana w komórkach T98G zależność między poziomem GAB i *GATA3* pozwoliła postawić hipotezę, że w tkankach GBM na skutek braku ekspresji GAB poziom ekspresji *GATA3* będzie znikomy. Jednak wyniki uzyskane dla tkanek GBM ludzkiego i nienowotworowych tkanek mózgowych ekspresyjnie GAB nie potwierdziły zależności między poziomem ekspresji obu genów i kodowanych przez nie obu białek (Ryc. V.8.). Z dziewięciu próbek GBM, z których żadna nie ekspresyowała GAB (Szeliga i wsp., 2016), większość wykazywała wyraźne podwyższenie ekspresji genu i poziomu białka *GATA3* w porównaniu z tkankami nienowotworowymi, pozostałe z nich prezentowały podobny lub niższy poziom *GATA3* (Ryc. V.8.). Wszystkie tkanki nienowotworowe, u których potwierdzono ekspresję *GLS2*, wykazywały niski poziom *GATA3* (Ryc. V.8.). Analiza statystyczna wykazała, że ilość *GATA3* w tkankach GBM ponad kilkukrotnie przewyższała poziom tego białka w tkankach nienowotworowych, co zaprzecza hipotezie zakładającej korelację między poziomem GAB i *GATA3*. Uzyskane wyniki sugerują, że zależność zaobserwowana między poziomem GAB i *GATA3* wydaje się być jedynie wynikiem manipulacji *in vitro* przeprowadzonej w komórkach linii T98G, natomiast nie ma odzwierciedlenia w materiale klinicznym. Tezę tę potwierdzają wyniki badań przeprowadzonych na komórkach linii U87MG. W przeciwieństwie do komórek T98G, komórki U87MG po transfekcji sekwencją GAB wykazały istotnie statystycznie obniżenie ekspresji *GATA3* oraz poziomu kodowanego przez ten gen białka (Ryc. V.7.). Obserwacja ta ostatecznie zaprzecza regulowaniu *GATA3* przez GAB, a dodatkowo zwraca uwagę na ostrożność, jaką należy zachować we wnioskowaniu na podstawie wyników doświadczeń prowadzonych na pojedynczych liniach komórkowych. Istotnym elementem warunkującym rozbieżność między materiałem klinicznym i unieśmiertelnionymi liniami komórkowymi jest homogenność linii komórkowej

i heterogenność molekularna i komórkowa tkanek GBM (Aldape i wsp., 2015). Heterogenność guzów stanowi poważne wyzwanie nie tylko dla opracowania zindywidualizowanej terapii, ale także dla stworzenia modeli wiernie odwzorowujących warunki *in vivo* (Gillet i wsp., 2013). Heterogenność może być przyczyną zróżnicowanej aktywności ścieżek sygnałowych prowadzących do ekspresji *GATA3*. Rola *GATA3* w patogenezie GBM i mechanizmy regulacji ekspresji kodującego go genu są nadal zagadnieniem wymagającym dalszych badań.

#### **VI.4. Wpływ GAB na modulowanie szlaku AKT**

Dane literaturowe świadczą o istnieniu zależności pomiędzy poziomem *GLS2* i stopniem ufosforylowania AKT (Liu i wsp., 2014). Nadekspresja *GLS2* w komórkach raka wątroby obniża poziom fosforylacji AKT zarówno na Thr308, jak i Ser473 wpływając przy tym na zahamowanie wzrostu i proliferacji tych komórek (Liu i wsp., 2014). Fakt ten stał się punktem wyjścia do postawienia hipotezy, że transfekcja GAB wpłynie na poziom fosforylacji białek należących do szlaku AKT. Warto zaznaczyć, że fosforylacja na Thr308 jest niezbędna i zarazem wystarczająca do aktywacji AKT, jednakże do osiągnięcia maksymalnej aktywności konieczna jest fosforylacja na Ser473 (Alessi i Cohen, 1998; Dangelmaier i wsp., 2014; Guertin i wsp., 2006).

W niniejszej pracy nie wykazano zmian w poziomie białka całkowitego AKT w komórkach żadnej z trzech linii GBM po transfekcji sekwencją GAB (Ryc. V.9.). Ponadto GAB nie wpłynęła na poziom ufosforylowania AKT w komórkach T98G i LN229. Obniżenie stopnia fosforylacji AKT na Thr308 i Ser473 zaobserwowano jedynie w komórkach UGAB w porównaniu do komórek kontrolnych UpcDNA (Ryc. V.9.). Transfekcja sekwencją GAB komórek U87MG prowadzi do obniżenia poziomu fosforylacji PI3K na Tyr199, a także poziomu fosforylacji PDK1 na Ser241 oraz białka całkowitego PDK1 (Ryc. V.9.), bezpośrednio fosforylującej AKT na Thr308 (Dangelmaier i wsp., 2014). Dotychczas nie udało się zidentyfikować źródła zaobserwowanych różnic w fosforylacji białek należących do szlaku AKT pomiędzy linią U87MG, a komórkami T98G i LN229 po transfekcji GAB. Brak zmian w fosforylacji AKT w komórkach T98G i LN229 po transfekcji GAB sugeruje istnienie mechanizmu niezależnego od szlaku AKT leżącego u podstaw zmian obserwowanych pod wpływem

transfekcji komórek sekwencją kodującą GAB. Pomimo odrzucenia hipotezy zakładającej, że GAB wpływa na szlak sygnałowy AKT w komórkach wszystkich linii GBM, wyniki niniejszej pracy pokazują, że GAB moduluje tę ścieżkę sygnałową w komórkach o określonym genotypie. Zidentyfikowanie przyczyn oraz konsekwencji rozregulowania ścieżki AKT w komórkach U87MG transfekowanych sekwencją kodującą GAB wymaga dodatkowych badań.

## **VI.5. Wpływ GAB na wrażliwość komórek na stres oksydacyjny – rola szlaku AKT**

Transfekcja sekwencją kodującą GAB uwrażliwia komórki T98G na działanie czynników indukujących stres oksydacyjny takich jak tlenek arsenu (III) (ang. *arsenic trioxide*, ATO) czy H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Martín-Rufián i wsp., 2014). Przeprowadzone i opisane w podrozdziale V.6. badania wykazały, że nie tylko komórki T98G, ale także komórki U87MG i LN229 po transfekcji sekwencją GAB stają się bardziej wrażliwe na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ryc.V.11.). Jak zaznaczono we wcześniejszych rozdziałach, GAB negatywnie reguluje szlak sygnałowy AKT w komórkach raka wątroby (Liu i wsp., 2014), natomiast H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w komórkach T98G indukuje fosforylację AKT (Sonoda i wsp., 1999). Bazując na tych informacjach sformułowano hipotezę zakładającą, że szlak AKT jest słabiej aktywowany poprzez działanie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w komórkach GBM transfekowanych GAB w porównaniu do komórek kontrolnych pcDNA, co prowadzi do zwiększonej wrażliwości komórek na działanie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

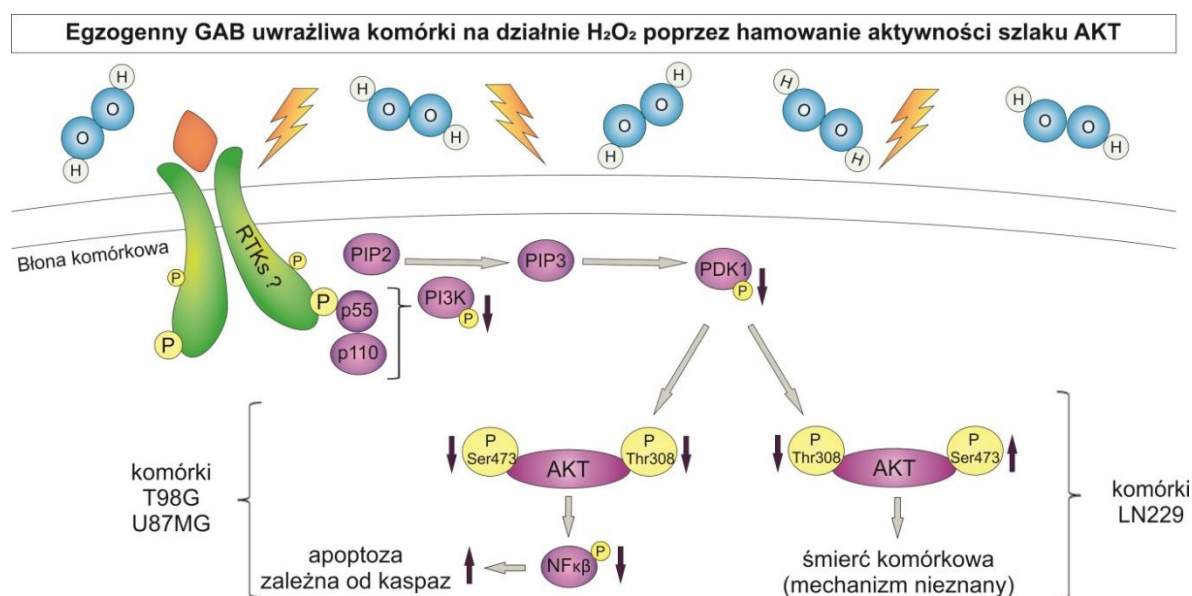
W przypadku komórek wszystkich trzech linii traktowanie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> słabiej indukowało fosforylację AKT na Thr308 w komórkach transfekowanych GAB niż w komórkach pcDNA. Ponadto, w komórkach TGAB i UGAB zaobserwowano także słabszą indukcję fosforylacji AKT na Ser473 w porównaniu do komórek kontrolnych. Natomiast komórki LN229 transfekowane GAB wykazują pod wpływem traktowania H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zwiększoną fosforylację AKT na Ser473 w porównaniu do komórek kontrolnych. W komórkach linii U87MG transfekowanych GAB w porównaniu z komórkami UpcDNA zaobserwowano znacznie zmniejszony poziom białka całkowitego, ale nie transkryptu AKT. W komórkach linii T98G i LN229 nie zaobserwowano zmian w poziomie białka całkowitego AKT po transfekcji GAB. Uzyskane wyniki sugerują, że

aktywność AKT w komórkach T98G i LN229 transfekowanych GAB i traktowanych  $H_2O_2$  jest modulowana na poziomie potranslacyjnym, podczas gdy w komórkach U87MG - na poziomie translacji i być może potranslacji. Zmniejszony poziom indukcji fosforylacji AKT w komórkach transfekowanych sekwencją GAB wynika najprawdopodobniej z obniżonej indukcji fosforylacji białek zaangażowanych w modulowanie aktywności AKT. Traktowanie  $H_2O_2$  słabiej indukowało fosforylację PDK1 i PI3K w komórkach linii transfekowanych GAB w porównaniu do komórek kontrolnych. Zmiany w aktywności PI3K mogą być wynikiem obniżenia aktywności receptorów kinazy tyrozynowej (ang. receptor tyrosine *kinases*, RTKs) przez egzogenną GAB. Stwierdzenie obniżenia poziomu białka całkowitego PDK1 w komórkach UGAB i LNGAB w porównaniu do komórek UpcDNA i LNpcDNA, a także obniżenia poziomu białka całkowitego PI3K w komórkach U87GAB w porównaniu do UpcDNA, dało podstawy do przeprowadzenia analizy ekspresji genów kodujących te białka. Nie zaobserwowano obniżenia ekspresji tych genów (Ryc. V.12 B-D). Wynik ten sugeruje, że GAB wpływa na translację ich mRNA. Na tej podstawie stwierdzono, że w komórkach wszystkich trzech linii egzogenna GAB powoduje słabszą aktywację szlaku AKT, chociaż mechanizmy odpowiedzialne za obserwowane zmiany mechanizmy są różne. Niezależnie od tych różnic, obniżenie poziomu fosforylacji AKT przyczynia się do zwiększania wrażliwości komórek wszystkich badanych linii GBM na działanie  $H_2O_2$ . Wniosek ten wynika z faktu, że preinkubacja komórek z PDGF-BB, aktywatorem fosforylacji AKT (Rauch i wsp., 2000), wykazuje w komórkach transfekowanych GAB działanie protekcyjne względem komórek traktowanych  $H_2O_2$ .

Jednym z białek, którego aktywność zależy m.in. od poziomu fosforylacji AKT jest czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B, którego indukcja obserwowana w GBM sprzyja rozwojowi tkanki nowotworowej (Friedmann-Morvinski i wsp., 2016; Nogueira i wsp., 2011). Czynniki NF- $\kappa$ B reguluje ekspresję genów kodujących m.in. białka hamujące apoptozę Bcl-xL, IAP i c-FLIP (Naugler. i Karin, 2008). Szlak AKT wpływa na aktywność transkrypcyjną NF- $\kappa$ B przez fosforylację i degradację inhibitora  $\kappa$ B (I $\kappa$ B), wobec czego obniżenie aktywności kaskady AKT hamuje transkrypcję genów zależną od NF- $\kappa$ B (Bai i wsp., 2009). W niniejszej rozprawie wykazano, że komórki TGAB i UGAB traktowane  $H_2O_2$  wykazywały w porównaniu z komórkami kontrolnymi pcDNA znacznie zredukowany poziom fosforylacji NF- $\kappa$ B na Ser536 oraz zwiększoną aktywność kaspaz 3/7. Wynik ten oznacza, że istotnym mechanizmem śmierci komórkowej, której ulegają

komórki T98G i U87MG transfekowane GAB poddane działaniu  $H_2O_2$  jest apoptoza zależna od kaspaz, w aktywacji której najprawdopodobniej pośredniczy obniżenie aktywności NF- $\kappa$ B. Wynik ten potwierdza sugestię, że GAB ma właściwości proapoptotyczne (Martín-Rufián i wsp., 2014). Należy zauważyć, że traktowanie komórek LNGAB  $H_2O_2$  skutkowało tendencją do zwiększania poziomu fosforylowanego NF- $\kappa$ B, ale nie zmieniało aktywności kaspaz 3/7, co oznacza że apoptoza zależna od kaspaz nie jest głównym mechanizmem śmierci w tych komórkach.

Proponowany mechanizm działania GAB w warunkach stresu oksydacyjnego indukowanego ekspozycją na  $H_2O_2$  w uproszczeniu przedstawiono na Ryc. VI.1.



**Ryc. VI.1. Proponowany mechanizm regulacji szlaku AKT w komórkach linii T98G, U87MG i LN229 przez egzogenną GAB prowadzący do uwrażliwienia komórek na działanie stresu oksydacyjnego indukowanego  $H_2O_2$ .** Transfekcja GAB zwiększa wrażliwość komórek linii GBM T98G, U87MG i LN229 na indukowany przez  $H_2O_2$  stres oksydacyjny. Po traktowaniu  $H_2O_2$  komórki wszystkich badanych linii transfekowane GAB wykazują obniżone poziomy ufosforylowanego PI3K i PDK1 w porównaniu do transfektantów pcDNA. Zmiany w aktywności kaskady sygnałowej PI3K mogą być wynikiem hamowania działania RTKs przez GAB. Transfekowane sekwencją GAB komórki T98G i U87MG wykazują zmniejszoną fosforylację AKT zarówno na Thr308 i Ser473, zmniejszoną fosforylację NF- $\kappa$ B i zwiększoną aktywność kaspaz 3/7 co sugeruje, że ich śmierć następuje w wyniku apoptozy zależnej od kaspaz. Brak zmian w poziomie fosforylacji NF- $\kappa$ B i aktywności kaspaz 3/7, wyklucza śmierć komórek



LNGAB na drodze apoptozy zależnej od kaspaz. Należy zauważyć, że w przeciwieństwie do transfekowanych GAB komórek T98G i U87MG, komórki LN229 transfekowane GAB wykazują zwiększoną fosforylację AKT na Ser473: konsekwencje tej różnicy (jeśli w ogóle istnieją) nie są znane.

## VII. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI

1. Transfekcja komórek GBM linii T98G, U87MG, LN229 sekwencją kodującą GAB obniża przeżywalność, indeks proliferacji oraz zdolności formowania kolonii, a w liniach T98G i LN229 hamuje także zdolności migracyjne tych komórek.

### WNIOSEK I

**Powyższe obserwacje wspierają hipotezę o hamującym działaniu egzogennej GAB na wyżej wymienione własności komórek GBM o różnym genotypie i potencjale do tworzenia nowotworów w układzie *in vivo*.**

2. Transfekcja komórek T98G sekwencją GAB powoduje wzrost poziomu ekspresji genu *GATA3* i białka GATA3.
3. W komórkach linii U87MG transfekcja sekwencją GAB obniża poziom ekspresji genu *GATA3* i białka GATA3.
4. W nienowotworowych tkankach mózgu ekspresyjnym GAB poziom GATA3 jest niski, natomiast w tkankach GBM nieekspresyjnym GAB poziom GATA3 jest zróżnicowany.

### WNIOSEK II

**Powyższe dane wykluczają istnienie zależności między poziomem GAB a GATA3 w komórkach GBM.**

5. Transfekcja komórek T98G i LN229 sekwencją kodującą GAB nie wpływa na poziom fosforylacji AKT.

### WNIOSEK III

**Mechanizm odpowiedzialny za zmiany fenotypowe obserwowane w komórkach T98G i LN229 transfekowanych sekwencją kodującą GAB nie jest związany z modulacją szlaku AKT.**

6. Transfekcja komórek linii ludzkiego GBM sekwencją kodującą GAB prowadzi do uwrażliwienia tych komórek na działanie stresu oksydacyjnego indukowanego przez H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
7. W warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego przez H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> egzogenna GAB hamuje indukcję szlaku AKT, a uprzednia aktywacja tego szlaku ma działanie protekcyjne względem komórek traktowanych H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
8. W komórkach linii T98G i U87MG eksponowanych na działanie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> egzogenna GAB indukuje proces apoptozy zależnej od kaspaz. W komórkach linii LN229 eksponowanych na działanie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> egzogenna GAB skutkuje wystąpieniem tendencji do zwiększania poziomu fosforylowanego NF- $\kappa$ B, przy czym nie wpływa na aktywność kaspaz 3/7.

#### **WNIOSEK IV**

**Zahamowanie aktywności szlaku AKT przez GAB przekłada się na wzmożoną wrażliwość komórek transfekowanych GAB na czynniki stresu oksydacyjnego. Egzogenna GAB w komórkach T98G i U87MG poddanych działaniu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promuje – najprawdopodobniej poprzez zahamowanie aktywności NF- $\kappa$ B –apoptozę tych komórek, natomiast w komórkach linii LN229 eksponowanych na działanie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indukuje śmierć komórkową innego rodzaju niż apoptoza zależna od kaspaz.**

## VIII. INNOWACYJNOŚĆ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

1. Określenie wpływu egzogennej GAB na własności biologiczne komórek linii GBM różniących się pod względem profilu genetycznego i zdolności do tworzenia nowotworów w układzie *in vivo*.
2. Wykazanie braku zależności pomiędzy poziomem GAB a GATA3 w komórkach GBM.
3. Udowodnienie, że egzogenna GAB hamuje w komórkach GBM aktywność szlaku AKT zwiększając w ten sposób ich wrażliwość na działanie stresu oksydacyjnego indukowanego ekspozycją na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## IX. STRESZCZENIE

Glutamina (Gln) i glutaminian (Glu) odgrywają kluczową rolę w kształtowaniu złośliwego fenotypu glioblastoma (ang. *glioblastoma*, GBM, WHO IV). Gln stanowi główny metabolit energetyczny oraz źródło azotu do syntezy nukleotydów, a Glu wydzielany w dużych ilościach przez komórki nowotworowe działa ekscytotoksycznie na neurony i komórki astrogleju w otoczeniu guza przyczyniając się do rozrostu tkanki nowotworowej. Ponadto Glu jest prekursorem glutationu (GSH), przeciwutleniacza w dużej mierze odpowiedzialnego za oporność GBM na chemio- i radioterapię. Przedmiotem szczególnie intensywnych badań stała się glutaminaza (GA, EC 3.5.1.2), enzym katalizujący hydrolizę Gln do Glu i jonów amonowych. W komórkach ssaków GA kodowana jest przez dwa geny: gen *Gls*, który koduje izoformy typu nerkowego (ang. *kidney-type glutaminase* - KGA i GAC) i gen *Gls2* kodujący izoformy typu wątrobowego (ang. *liver-type glutaminase* - GAB i LGA).

Rozregulowana ekspresja i/lub aktywność różnych izoform GA jest cechą charakterystyczną komórek nowotworowych o różnej histogenezie. Dane literaturowe sugerują, że izoformy GA pełnią w komórkach nowotworowych przeciwstawne funkcje. Izofomy GA typu nerkowego ulegają silnej ekspresji w komórkach intensywnie proliferujących, podczas gdy izofomy GA typu wątrobowego są charakterystyczne dla komórek o niskim poziomie proliferacji. Złagodzenie złośliwego fenotypu komórek można osiągnąć poprzez wyciszenie ekspresji genu *GLS* bądź na skutek indukcji ekspresji genu *GLS2*.

W tkankach GBM obserwuje się silną ekspresję genu *GLS*, przy braku lub śladowej ekspresji genu *GLS2*, czego przyczyną jest hipermetylacja DNA w obrębie *GLS2*. Transfekcja komórek GBM linii T98G sekwencją kodującą GAB obniża przeżywalność i indeks proliferacji oraz zdolności migracyjne tych komórek. Molekularne mechanizmy leżące u podstaw obserwowanych zmian we własnościach biologicznych komórek transfekowanych sekwencją GAB pozostają nieznanne. Stwierdzenie obecności GAB nie tylko w mitochondriach, ale i jądrach komórkowych neuronów i astrocytów oraz wykazanie oddziaływań GAB z białkami zawierającymi domenę PDZ dało podstawy do stworzenia hipotezy, że poza rolą enzymatyczną GAB może być zaangażowana bezpośrednio lub pośrednio w regulację transkrypcji genów.

Transfekcja sekwencją GAB komórek T98G zmienia ekspresję licznych genów, w tym *GATA3*, którego ekspresja wzrosła w wyniku transfekcji. *GATA3* jest czynnikiem transkrypcyjnym zaangażowanym w regulację takich procesów jak hematopoeza, rozwój gruczołów mlekowych, skóry czy systemu nerwowego. Białko to wykazuje działanie pleiotropowe w kształtowaniu fenotypu różnych nowotworów: w przypadku neuroblastoma niski poziom *GATA3* związany jest z pozytywnym rokowaniem dla pacjentów, a w raku piersi czy pęcherza moczowego spadek poziomu *GATA3* koreluje ze wzrostem agresywności nowotworu. Ponadto, *GATA3* wpływa na poziom cytokin, których rozregulowany poziom stwierdzono w GBM, np. IL-10, IL-6, STAT3. Poziom ekspresji ani rola białka *GATA3* w GBM nie była do tej pory zbadana.

Dane literaturowe wskazują na zależność pomiędzy poziomem *GLS2* i poziomem ufosforylowania AKT. AKT odpowiada za fosforylację wielu białek zaangażowanych między innymi w regulację wzrostu komórek, cyklu komórkowego, apoptozy czy metabolizmu glukozy. Komórki raka wątroby po transfekcji glutaminazą typu wątrobowego wykazują obniżenie fosforylacji AKT. Warto zaznaczyć, że jednym z czynników indukujących fosforylację AKT jest  $H_2O_2$ , czynnik na który komórki TGAB są bardziej wrażliwe niż komórki T98G.

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu transfekcji sekwencją kodującą GAB na własności biologiczne komórek linii GBM różniących się między sobą oraz od komórek T98G pod względem genetycznym i pod względem zdolności do formowania nowotworów *in vivo*. Ponadto podjęto próbę przybliżenia molekularnych mechanizmów mogących być przyczyną zmian wywołanych przez transfekcję kodującą GAB. W odniesieniu do tej części badań sformułowano hipotezę zakładającą, że zmiany obserwowane w fenotypie transfekowanych komórek są konsekwencją rozregulowania ekspresji genów, z których część koduje białka związane z procesem nowotworzenia oraz hamowania przez GAB aktywności szlaku AKT.

W prezentowanej pracy potwierdzono wpływ GAB na własności biologiczne komórek linii ludzkiego GBM, różniących się między sobą pod względem profilu genetycznego i zdolności do tworzenia nowotworów w układzie *in vivo*. Transfekcja komórek T98G, U87MG i LN229 sekwencją kodującą GAB (komórki –GAB) obniżyła przeżywalność, proliferację, a także zdolności do formowania tych komórek w porównaniu do komórek dzikich oraz komórek transfekowanych pustym wektorem

(komórki –pcDNA). W komórkach TGAB i LNGAB zaobserwowano także zredukowaną zdolność do migracji.

Transfekcja komórek linii ludzkiego GBM nie wpłynęła na wewnątrzkomórkowy poziom Gln i Glu, co sugeruje, że zmiany fenotypowe obserwowane w transfekowanych komórkach są konsekwencją innej niż enzymatyczna roli GAB w tych komórkach.

Potwierdzono znacznie podwyższony poziom ekspresji genu *GATA3* oraz wykazano podwyższony poziom białka *GATA3* w komórkach T98G po transfekcji sekwencją GAB w porównaniu do komórek kontrolnych. Analiza poziomu *GATA3* w materiale klinicznym nie potwierdziła zaobserwowanej w komórkach linii T98G zależności pomiędzy poziomem GAB i *GATA3*. Poziom *GATA3* w tkankach GBM był kilkakrotnie wyższy od poziomu tego białka w tkankach nienowotworowych. Wyniki te sugerują, że zależność zaobserwowana między poziomem GAB i *GATA3* może być jedynie wynikiem manipulacji *in vitro* przeprowadzonej w tej konkretnej linii komórkowej GBM. Tezę tę potwierdzono badaniami wykonanymi na komórkach linii U87MG. Komórki U87MG po transfekcji sekwencją GAB wykazują obniżenie ekspresji *GATA3* oraz poziomu kodowanego przez niego białka, co również zaprzecza regulowaniu *GATA3* przez GAB. Powyższe wyniki zwracają uwagę na ostrożność z jaką należy interpretować dane uzyskane w doświadczeniach prowadzonych na liniach komórkowych, które nie zawsze wiernie odwzorowują warunki *in vivo*.

Przeprowadzona analiza nie wykazała zmian w poziomie białka całkowitego AKT w żadnej z trzech linii GBM po transfekcji sekwencją GAB, a obniżenie w poziomie fosforylacji AKT na Thr308 i Ser473 zaobserwowano jedynie w komórkach UGAB w porównaniu do komórek UpcDNA. Transfekcja komórek U87MG sekwencją GAB prowadzi do obniżenia poziomu fosforylacji PI3K na Tyr199 (pPI3K), niezbędnej do translokacji AKT w pobliże błony komórkowej i późniejszej jej fosforylacji, a także poziomu białka całkowitego oraz fosforylacji PDK1 na Ser241 (pPDK1), bezpośrednio odpowiedzialnej za fosforylację AKT na Thr308. Brak zmian w fosforylacji AKT w komórkach T98G i LN229 po transfekcji GAB wskazuje na inny mechanizm działania GAB prowadzący do obniżenia przeżywalności i proliferacji komórek. Pomimo odrzucenia hipotezy, że GAB wpływa na szlak sygnałowy AKT w komórkach wszystkich badanych linii GBM wyniki pracy sugerują, że GAB moduluje ten szlak w komórkach o określonym genotypie.

Dotychczasowe badania wykazały, że komórki T98G po transfekcji GAB stają się bardziej wrażliwe na działanie czynników stresu oksydacyjnego, w tym  $H_2O_2$ . W niniejszej pracy wykazano, że komórki wszystkich badanych linii GBM po transfekcji sekwencją GAB stają się bardziej wrażliwe na działanie  $H_2O_2$ . W celu wyjaśnienia mechanizmu obserwowanego zjawiska ponownie poddano analizie szlak AKT, jednakże tym razem w warunkach działania na komórki  $H_2O_2$ , który indukuje fosforylację białka AKT. Zgodnie z hipotezą, że transfekcja sekwencją kodującą GAB uwrażliwia komórki na działanie  $H_2O_2$  poprzez modulowanie szlaku AKT, zaobserwowano obniżenie poziomu fosforylacji AKT na Thr308, a także pPDK1 i pPI3K w komórkach linii GBM po transfekcji. W komórkach TGAB i UGAB zaobserwowano także obniżenie poziomu fosforylacji AKT na Ser473. Wyniki te wskazują na zmniejszoną aktywację szlaku AKT przez egzogenną GAB. W komórkach LNGAB stwierdzono zwiększoną fosforylację AKT na Ser473, jednakże przyczyny tej różnicy pozostają nieznane. Obniżenie poziomu białka całkowitego, ale nie transkrypty *AKT*, które obserwowano tylko w komórkach UGAB w porównaniu z komórkami UpcDNA sugeruje, że aktywność AKT w komórkach T98G i LN229 jest modulowana na poziomie potranslacyjnym, podczas gdy w komórkach U87MG na poziomie zarówno translacyjnym, jak i potranslacyjnym. Podobnie za obniżenie poziomu białka całkowitego PDK1 w komórkach U87MG i LN229 oraz PI3K w komórkach U87MG mogą odpowiadać mechanizmy translacyjne jak i potranslacyjne.

Niezależnie od zaobserwowanych różnic między badanymi liniami komórkowymi GBM stwierdzono, że transfekcja sekwencją GAB prowadzi do obniżonego poziomu fosforylacji AKT w komórkach wszystkich badanych linii komórkowych w porównaniu z komórkami kontrolnymi pcDNA w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego przez  $H_2O_2$ . Wywołane przez egzogenną GAB obniżenie aktywności szlaku AKT przyczynia się do zwiększania wrażliwości badanych linii GBM na  $H_2O_2$ . Wniosek ten został sformułowany na podstawie obserwacji, że preinkubacja komórek z PDGF-BB, aktywatorem fosforylacji AKT, chroni komórki transfekowane GAB przed śmiercią spowodowaną działaniem  $H_2O_2$ .

Poziom fosforylacji AKT może wpływać na aktywność czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B. W niniejszej rozprawie wykazano, że komórki TGAB i UGAB pod wpływem działania  $H_2O_2$  wykazują znaczącą redukcję fosforylacji NF- $\kappa$ B na Ser536 oraz zwiększoną aktywność kaspaz 3/7 w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Wyniki



te sugerują, że egzogenna GAB w komórkach T98G i U87MG poddanych działaniu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promuje apoptozę tych komórek poprzez obniżenie aktywności NF-κβ. Należy zauważyć, że traktowanie komórek LNGAB za pomocą H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> skutkowało tendencją do zwiększania poziomu fosforylowanego NF-κβ, przy czym nie zmieniało aktywności kaspaz 3/7, co sugeruje że komórki tej linii GBM ulegają śmierci w wyniku innego mechanizmu niż apoptoza zależna od kaspaz.

## X. ABSTRACT

Glutamine (Gln) plays a crucial role in the metabolism of neoplastic cells and tissues. Upregulated catabolism of this amino acid is observed in many different types of tumors and is critical for tumor progression. Catabolism of Gln results in production of which released from GBM cells causes excitotoxicity contributing to the expansion of tumor cells. Moreover, intracellular Glu is a precursor of antioxidant glutathione (GSH), one of the factors contributing to radio- and chemoresistance. Phosphate-activated glutaminase (GA, EC 3.5.1.2) is an enzyme which converts Gln to Glu and ammonia. There are two genes coding for human GA: the *GLS* gene encodes GLS (kidney-type) isoforms (transcripts KGA and GAC), and the *GLS2* gene codes for GLS2 (liver-type) isoforms (transcripts GAB and LGA).

Several studies revealed that glutaminase isoforms play opposite roles in tumorigenesis. Kidney-type isoforms are associated with high rate of cells proliferation, whereas liver-type isoforms are related to resting or quiescent cell states. Suppression of the malignant phenotype can be obtained by silencing *GLS* or overexpression of *GLS2*.

In GBM expression of *GLS* is abundant, whereas expression of *GLS2* is hardly detectable. It was shown that stable transfection of human glioblastoma cell line T98G with a sequence coding for the liver-type glutaminase GAB decreased cell viability, proliferation, migration and ability to form colonies. However, the mechanisms underlying these changes remains unknown. Nuclear localization of GAB in neurons and astrocytes and its interactions with PDZ-containing proteins led to hypothesis that this molecule can modulate gene expression. Consistent with this hypothesis, microarray analysis revealed that transfection of T98G cells with GAB sequence deregulated expression of several genes some of which code for proteins involved in tumorigenesis.

*GATA3* is one of the genes whose expression is upregulated in TGAB cells as compared to the controls. This gene codes for a multifunctional transcription factor which plays an important role in the development of several tissues including brain. Role of *GATA3* in progression and development of tumors of different tissue origin seems to be ambiguous. The loss of *GATA3* expression in breast cancer is related to aggressive tumor development, metastatic capability and poor prognosis. Similarly, the low level of *GATA3* correlates with the promotion of cell migration and invasion of bladder cancer

cells. On the other hand upregulation of GATA3 correlates with a poor outcome of neuroblastoma patients. GATA3 affects the level of different cytokines, some of which are deregulated in GBM. The level of expression or the role of GATA3 in GBM has not been studied so far.

A recent study revealed that *GLS2* is a negative regulator of the protein kinase B (AKT) signaling. A decrease in phosphorylation level of AKT was observed in hepatocellular carcinoma (HCC) cells transfected with *GLS2*. The AKT signaling pathway plays a crucial role in regulation of cell growth, survival, proliferation, motility, and metabolism. Deregulation of this pathway is a characteristic feature of tumors of different origin. Previous studies revealed that TGAB cells are more sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-evoked oxidative stress. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has been shown to induce phosphorylation of AKT.

The aim of this study was to examine the effects of transfection with GAB on the biological properties of human GBM cell lines varying with respect to the genetic background and tumorigenic potential and to shed some light on the molecular mechanism underlying the GAB-mediated phenotypic changes. Based on the literature data a hypothesis assuming that these changes arise from deregulation of expression of genes coding for proteins involved in tumorigenesis and from inhibition of the AKT pathway was constructed.

Transfection of T98G, U87MG and LN229 cells with the GAB sequence (herein named -GAB) reduced survival, proliferation, and ability to form colonies of these cells. In TGAB and LNGAB cells a reduced migration potential was also observed. These results suggest that exogenous GAB suppresses cell properties mentioned above regardless of the genetic profile and tumorigenic potential of the cells.

Transfection of GBM cells did not affect intracellular level of Gln or Glu, suggesting that other than enzymatic function of exogenous GAB mediates the phenotypical changes observed in the transfected cells. To test this hypothesis further studies are required.

Previous study showed that transfection of T98G cells with the GAB sequence changed the expression level of several genes, including *GATA3*. In this study, elevation of *GATA3* transcript and its protein in TGAB cells was confirmed. Lack of correlation between the level of GAB and *GATA3* was found in GBM and non-neoplastic brain

tissues. GATA3 level in GBM tissues lacking GAB transcript was several times higher compared to non-neoplastic tissues expressing GAB. These results suggest that the correlation between the level of GAB and GATA3 observed in T98G cells can be the result of *in vitro* manipulation carried out in this particular GBM cell line, whereas it is not reflected in the clinical material. This suggestion was confirmed by the experiments conducted in U87MG cell line. Transfection with GAB sequence decreased the levels of GATA3 transcript and protein in U87MG cells denying the correlation between GATA3 and GAB. These findings point to the fact that the results obtained in experiments carried out on cell lines must be interpreted with caution.

To verify the hypothesis assuming that GAB modulate the AKT pathway, the levels of the molecules belonging to this pathway were examined in pcDNA- and GAB-transfected cells. The analysis did not reveal any changes in the total AKT protein level between the GAB-transfected and control cells. The reduction in the level of AKT phosphorylation on Thr308 and Ser473 was observed in UGAB cells compared to their controls. UGAB cells presented also a decrease in the level of pPI3K, pPDK1 and PDK1 proteins which are involved in the activation of AKT. Lack of alterations in AKT phosphorylation in T98G and LN229 cells after GAB transfection indicates an AKT-independent mechanism of GAB action underlying the GAB-mediated changes in these cells. These results suggest that GAB may modulate the AKT pathway, but only in the cells of a particular genetic background.

Previous studies have shown that transfection with GAB sensitizes T98G cells to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-evoked oxidative stress. The results of this study show that GAB-transfected U87MG and LN229 cells are also more susceptible to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-evoked oxidative stress compared to the control cells. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated signaling induces AKT phosphorylation, therefore it was reasonable to speculate that in GAB-transfected cells AKT phosphorylation was less induced upon H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. Indeed, GAB-transfected cells of all three cell lines examined treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presented a decrease in the level of AKT phosphorylation on Thr308 as well as of pPDK1 and pPI3K compared to their pcDNA-transfected counterparts. A decrease in AKT phosphorylation level on Ser473 was also observed in TGAB and UGAB cells compared to the pcDNA-transfected cells. These results indicate a reduced activation of the AKT pathway GAB-transfected cells. Of note, LNGAB cells showed an increase in the phosphorylation level of AKT on Ser473. The reasons of this phenomenon remain unknown. A decrease in the level of total AKT

protein, but not *AKT* transcript, was observed in UGAB cells compared to the UpcDNA. A diminished level of PDK1 and PI3K total proteins was observed in UGAB cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, while LNGAB cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exhibited the reduced level of PDK1 compared to the controls. Lack of changes in the transcripts coding for PDK1 and PI3K was observed between GAB- and pcDNA-transfected cells. Taken together, these results suggest that depending on the cell line the activity of the main molecules of the AKT pathway is regulated at post-transcriptional or both post-transcriptional and transcriptional levels upon the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. To elucidate the detailed molecular mechanism of downregulation of AKT signaling pathway by exogenous GAB in both unstressed and stressed conditions further studies are required.

It should be stressed that downregulation of AKT signaling pathway induced by exogenous GAB significantly contributes to the increased sensitivity of GAB-transfected cells to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. This conclusion is based on the fact that pretreatment with PDGF-BB, an activator of AKT phosphorylation, protected GAB-transfected cells from death caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

AKT phosphorylation level may affect the activity of the NF- $\kappa$ B transcription factor. In this dissertation, TGAB and UGAB cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> showed a significant reduction in the phosphorylation level of NF- $\kappa$ B on Ser536 and increased activity of caspase 3/7 compared to control cells. Therefore, it is tempting to speculate that exogenous GAB in T98G and U87MG cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promotes apoptosis by reduction of the activity of NF- $\kappa$ B. It should be noted that treatment of LNGAB cells with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resulted in a tendency to increase phosphorylation level of NF- $\kappa$ B without altering caspase 3/7 activities. These results suggest that the caspase-mediated apoptosis does not significantly contribute to the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-evoked cells death of LNGAB cells.

## XI. LITERATURA

1. Ahmed R, Oborski MJ, Hwang M, Lieberman FS, Mountz JM. Malignant gliomas: current perspectives in diagnosis, treatment, and early response assessment using advanced quantitative imaging methods. *Cancer Manag Res.* 2014 Mar 24;6:149-170. doi: 10.2147/CMAR.S54726.
2. Albrecht J, Sidoryk-Węgrzynowicz M, Zielińska M, Aschner M. Roles of glutamine in neurotransmission. *Neuron Glia Biol.* 2010a Nov;6(4):263-276. doi: 10.1017/S1740925X11000093.
3. Albrecht J, Zielińska M, Norenberg MD. Glutamine as a mediator of ammonia neurotoxicity: A critical appraisal. *Biochem Pharmacol.* 2010b Nov 1;80(9):1303-1308. doi: 10.1016/j.bcp.2010.07.024.
4. Aldape K, Zadeh G, Mansouri S, Reifenberger G, von Deimling A. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol.* 2015 Jun;129(6):829-848. doi: 10.1007/s00401-015-1432-1.
5. Aledo JC, Gómez-Fabre PM, Olalla L, Márquez J. Identification of two human glutaminase loci and tissue-specific expression of the two related genes. *Mamm Genome.* 2000 Dec;11(12):1107-1110.
6. Aledo JC, Segura JA, Medina MA, Alonso FJ, Núñez de Castro I, Márquez J. Phosphate-activated glutaminase expression during tumor development. *FEBS Lett.* 1994 Mar 14;341(1):39-42.
7. Alessi DR, Cohen P. Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev.* 1998 Feb;8(1):55-62.
8. Alexandrow MG, Moses HL. Transforming growth factor beta and cell cycle regulation. *Cancer Res.* 1995 Apr 1;55(7):1452-1457.
9. Alifieris C, Trafalis DT. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol Ther.* 2015 Aug;152:63-82. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.05.005.
10. Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene.* 2005 Nov 14;24(50):7455-7464. doi: 10.1038/sj.onc.1209085
11. Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front Pharmacol.* 2014 Aug 26;5:196. doi: 10.3389/fphar.2014.00196.

12. Bai D, Ueno L, Vogt PK, Akt-mediated regulation of NFkappaB and the essentialness of NFkappaB for the oncogenicity of PI3K and Akt. *Int J Cancer*. 2009 Dec 15;125(12):2863-2870. doi: 10.1002/ijc.24748.
13. Bellacosa A, Chan TO, Ahmed NN, Datta K, Malstrom S, Stokoe D, McCormick F, Feng J, Tsichlis P. Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene*. 1998 Jul 23;17(3):313-325.
14. Bhattacharya K, Maiti S, Mandal C. PTEN negatively regulates mTORC2 formation and signaling in grade IV glioma via Rictor hyperphosphorylation at Thr1135 and direct the mode of action of an mTORC1/2 inhibitor. *Oncogenesis*. 2016 May 30;5(5):e227. doi: 10.1038/oncsis.2016.34.
15. Bleeker FE, Lamba S, Zanon C, Molenaar RJ, Hulsebos TJ, Troost D, van Tilborg AA, Vandertop WP, Leenstra S, van Noorden CJ, Bardelli A. Mutational profiling of kinases in glioblastoma. *BMC Cancer*. 2014 Sep 26;14:718. doi: 10.1186/1471-2407-14-718.
16. Botman D, Tigchelaar W, Van Noorden CJ. Determination of phosphate-activated glutaminase activity and its kinetics in mouse tissues using metabolic mapping (quantitative enzyme histochemistry). *J Histochem Cytochem*. 2014 Nov;62(11):813-826. doi: 10.1369/0022155414551177.
17. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-254.
18. Bröer S, Brookes N. Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. *J Neurochem*. 2001 May;77(3):705-719.
19. Campos-Sandoval JA, Martín-Rufián M, Cardona C, Lobo C, Peñalver A, Márquez J. Glutaminases in brain: Multiple isoforms for many purposes. *Neurochem Int*. 2015 Sep;88:1-5. doi: 10.1016/j.neuint.2015.03.006.
20. Cardona C, Sánchez-Mejías E, Dávila JC, Martín-Rufián M, Campos-Sandoval JA, Vitorica J, Alonso FJ, Matés JM, Segura JA, Norenberg MD, Rama Rao KV, Jayakumar AR, Gutiérrez A, Márquez J. Expression of Glis and Glis2 glutaminase isoforms in astrocytes. *Glia*. 2015 Mar;63(3):365-382. doi: 10.1002/glia.22758.
21. Cascón A, Robledo M. MAX and MYC: a heritable breakup. *Cancer Res*. 2012 Jul 1;72(13):3119-3124. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3891.
22. Cassago A, Ferreira AP, Ferreira IM, Fornezari C, Gomes ER, Greene KS, Pereira HM, Garratt RC, Dias SM, Ambrosio AL. Mitochondrial localization and

- structure-based phosphate activation mechanism of Glutaminase C with implications for cancer metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jan 24;109(4):1092-1097. doi: 10.1073/pnas.1112495109.
23. Castell L, Vance C, Abbott R, Marquez J, Eggleton P. Granule localization of glutaminase in human neutrophils and the consequence of glutamine utilization for neutrophil activity. *J Biol Chem*. 2004 Apr 2;279(14):13305-13310.
  24. Cheng T, Sudderth J, Yang C, Mullen AR, Jin ES, Matés JM, DeBerardinis RJ. Pyruvate carboxylase is required for glutamine-independent growth of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 May 24;108(21):8674-8679. doi: 10.1073/pnas.1016627108.
  25. Chi CN, Bach A, Strømgaard K, Gianni S, Jemth P. Ligand binding by PDZ domains. *Biofactors*. 2012 Sep-Oct;38(5):338-348. doi: 10.1002/biof.1031.
  26. Chou J, Provot S, Werb Z. GATA3 in development and cancer differentiation: cells GATA have it! *J Cell Physiol*. 2010 Jan;222(1):42-49. doi: 10.1002/jcp.21943.
  27. Curi R, Newsholme P, Procopio J, Lagranha C, Gorjão R, Pithon-Curi TC. Glutamine, gene expression, and cell function. *Front Biosci*. 2007 Jan 1;12:344-357.
  28. Curthoys NP, Watford M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu Rev Nutr*. 1995;15:133-159. doi: 10.1146/annurev.nu.15.070195.001025.
  29. Dangelmaier C, Manne BK, Liverani E, Jin J, Bray P, Kunapuli SP. PDK1 selectively phosphorylates Thr(308) on Akt and contributes to human platelet functional responses. *Thromb Haemost*. 2014 Mar 3;111(3):508-17. doi: 10.1160/TH13-06-0484.
  30. de Groot JF, Liu TJ, Fuller G, Yung WK. The excitatory amino acid transporter-2 induces apoptosis and decreases glioma growth in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 2005 Mar 1;65(5):1934-1940. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3626.
  31. de Groot J, Sontheimer H. Glutamate and the biology of gliomas. *Glia*. 2011 Aug;59(8):1181-1189. doi: 10.1002/glia.21113.
  32. Dolińska M, Dybel A, Zabłocka B, Albrecht J. Glutamine transport in C6 glioma cells shows ASCT2 system characteristics. *Neurochem Int*. 2003 Sep-Oct;43(4-5):501-507.



33. Donadio AC, Lobo C, Tosina M, de la Rosa V, Martín-Rufián M, Campos-Sandoval JA, Matés JM, Márquez J, Alonso FJ, Segura JA. Antisense glutaminase inhibition modifies the O-GlcNAc pattern and flux through the hexosamine pathway in breast cancer cells. *J Cell Biochem.* 2008 Feb 15;103(3):800-811.
34. Dunn J, Baborie A, Alam F, Joyce K, Moxham M, Sibson R, Crooks D, Husband D, Shenoy A, Brodbelt A, Wong H, Liloglou T, Haylock B, Walker C. Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolomide and radiotherapy. *Br J Cancer.* 2009 Jul 7;101(1):124-131. doi: 10.1038/sj.bjc.6605127.
35. Elgadi KM, Meguid RA, Qian M, Souba WW, Abcouwer SF. Cloning and analysis of unique human glutaminase isoforms generated by tissue-specific alternative splicing. *Physiol Genomics.* 1999 Aug 31;1(2):51-62.
36. Ernest NJ, Sontheimer H. Extracellular glutamine is a critical modulator for regulatory volume increase in human glioma cells. *Brain Res.* 2007 May 4;1144:231-238. doi: 10.1016/j.brainres.2007.01.085.
37. Esencay M, Sarfraz Y, Zagzag D. CXCR7 is induced by hypoxia and mediates glioma cell migration towards SDF-1 $\alpha$ . *BMC Cancer.* 2013 Jul 17;13:347. doi: 10.1186/1471-2407-13-347.
38. Fan CH, Liu WL, Cao H, Wen C, Chen L, Jiang G. O6-methylguanine DNA methyltransferase as a promising target for the treatment of temozolomide-resistant gliomas. *Cell Death Dis.* 2013 Oct 24;4:e876. doi: 10.1038/cddis.2013.388..
39. Friedmann-Morvinski D, Narasimamurthy R, Xia Y, Myskiw C, Soda Y, Verma IM. Targeting NF- $\kappa$ B in glioblastoma: A therapeutic approach. *Sci Adv.* 2016 Jan 8;2(1):e1501292. doi: 10.1126/sciadv.1501292.
40. Gao P, Tchernyshyov I, Chang TC, Lee YS, Kita K, Ochi T, Zeller KI, De Marzo AM, Van Eyk JE, Mendell JT, Dang CV. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature.* 2009 Apr 9;458(7239):762-765. doi: 10.1038/nature07823.
41. Gaspar LE, Fisher BJ, Macdonald DR, LeBer DV, Halperin EC, Schold SC Jr, Cairncross JG. Supratentorial malignant glioma: patterns of recurrence and implications for external beam local treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1992;24(1):55-57.

42. Gaspar N, Marshall L, Perryman L, Bax DA, Little SE, Viana-Pereira M, Sharp SY, Vassal G, Pearson AD, Reis RM, Hargrave D, Workman P, Jones C. MGMT-independent temozolomide resistance in pediatric glioblastoma cells associated with a PI3-kinase-mediated HOX/stem cell gene signature. *Cancer Res.* 2010 Nov 15;70(22):9243-9252. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1250.
43. Giacobbe A, Bongiorno-Borbone L, Bernassola F, Terrinoni A, Markert EK, Levine AJ, Feng Z, Agostini M, Zolla L, Agrò AF, Notterman DA, Melino G, Peschiaroli A. p63 regulates glutaminase 2 expression. *Cell Cycle.* 2013 May 1;12(9):1395-1405. doi: 10.4161/cc.24478.
44. Gillet JP, Varma S, Gottesman MM. The clinical relevance of cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst.* 2013 Apr 3;105(7):452-458. doi: 10.1093/jnci/djt007.
45. Gómez-Fabre PM, Aledo JC, Del Castillo-Olivares A, Alonso FJ, Núñez De Castro I, Campos JA, Márquez J. Molecular cloning, sequencing and expression studies of the human breast cancer cell glutaminase. *Biochem J.* 2000 Jan 15;345 Pt 2:365-375.
46. Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, Brown M, Fitzgerald KJ, Sabatini DM. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell.* 2006 Dec;11(6):859-871.
47. Hamberger A, Nyström B. Extra- and intracellular amino acids in the hippocampus during development of hepatic encephalopathy. *Neurochem Res.* 1984 Sep;9(9):1181-1192.
48. Hardell L, Carlberg M, Söderqvist F, Mild KH, Morgan LL. Long-term use of cellular phones and brain tumours: increased risk associated with use for > or =10 years. *Occup Environ Med.* 2007 Sep;64(9):626-632. doi: 10.1136/oem.2006.029751.
49. Haas-Kogan D, Shalev N, Wong M, Mills G, Yount G, Stokoe D, Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MMAC. *Curr Biol.* 1998 Oct 22;8(21):1195-1198.
50. Hu W, Zhang C, Wu R, Sun Y, Levine A, Feng Z. Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Apr 20;107(16):7455-7460. doi: 10.1073/pnas.1001006107.

51. Inda MM, Bonavia R, Seoane J. Glioblastoma multiforme: a look inside its heterogeneous nature. *Cancers (Basel)*. 2014 Jan 27;6(1):226-239. doi: 10.3390/cancers6010226.
52. Ishii N, Maier D, Merlo A, Tada M, Sawamura Y, Diserens AC, Van Meir EG. Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol*. 1999 Jul;9(3):469-479.
53. Kahlert UD, Cheng M, Koch K, Marchionni L, Fan X, Raabe EH, Maciaczyk J, Glunde K, Eberhart CG. Alterations in cellular metabolome after pharmacological inhibition of Notch in glioblastoma cells. *Int J Cancer*. 2016 Mar 1;138(5):1246-1255. doi: 10.1002/ijc.29873.
54. Kanamori K, Ross BD. Quantitative determination of extracellular glutamine concentration in rat brain, and its elevation in vivo by system A transport inhibitor, alpha-(methylamino)isobutyrate. *J Neurochem*. 2004 Jul;90(1):203-210. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02478.x.
55. Kaur B, Brat DJ, Calkins CC, Van Meir EG. Brain angiogenesis inhibitor 1 is differentially expressed in normal brain and glioblastoma independently of p53 expression. *Am J Pathol*. 2003 Jan;162(1):19-27.
56. Kleihues P, Ohgaki H. Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors. *Toxicol Pathol*. 2000 Jan-Feb;28(1):164-170. doi: 10.1177/019262330002800121.
57. Kohsaka S, Takahashi K, Wang L, Tanino M, Kimura T, Nishihara H, Tanaka S. Inhibition of GSH synthesis potentiates temozolomide-induced bystander effect in glioblastoma. *Cancer Lett*. 2013 Apr 30;331(1):68-75. doi: 10.1016/j.canlet.2012.12.005.
58. Koul D. PTEN signaling pathways in glioblastoma. *Cancer Biol Ther*. 2008 Sep;7(9):1321-1325.
59. Lan F, Yang Y, Han J, Wu Q, Yu H, Yue X. Sulforaphane reverses chemoresistance to temozolomide in glioblastoma cells by NF- $\kappa$ B-dependent pathway downregulating MGMT expression. *Int J Oncol*. 2016 Feb;48(2):559-568. doi: 10.3892/ijo.2015.3271.
60. Lara-Velazquez M, Al-Kharboosh R, Jeanneret S, Vazquez-Ramos C, Mahato D, Tavanaiepour D, Rahmathulla G, Quinones-Hinojosa A. Advances in Brain Tumor Surgery for Glioblastoma in Adults. *Brain Sci*. 2017 Dec 20;7(12). pii: E166. doi: 10.3390/brainsci7120166.

61. Li R, Li H, Yan W, Yang P, Bao Z, Zhang C, Jiang T, You Y. Genetic and clinical characteristics of primary and secondary glioblastoma is associated with differential molecular subtype distribution. *Oncotarget*. 2015 Mar 30;6(9):7318-7324. doi: 10.18632/oncotarget.3440.
62. Li Y, Ishiguro H, Kawahara T, Kashiwagi E, Izumi K, Miyamoto H. Loss of GATA3 in bladder cancer promotes cell migration and invasion. *Cancer Biol Ther*. 2014 Apr;15(4):428-435. doi: 10.4161/cbt.27631.
63. Liu J, Zhang C, Lin M, Zhu W, Liang Y, Hong X, Zhao Y, Young KH, Hu W, Feng Z. Glutaminase 2 negatively regulates the PI3K/AKT signaling and shows tumor suppression activity in human hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2014 May 15;5(9):2635-2647. doi: 10.18632/oncotarget.1862.
64. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
65. Lobo C, Ruiz-Bellido MA, Aledo JC, Márquez J, Núñez De Castro I, Alonso FJ. Inhibition of glutaminase expression by antisense mRNA decreases growth and tumorigenicity of tumour cells. *Biochem J*. 2000 Jun 1;348 Pt 2:257-261.
66. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007 Aug;114(2):97-109. doi: 10.1007/s00401-007-0243-4.
67. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016 Jun;131(6):803-820. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1.
68. Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, DePinho RA. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev*. 2001 Jun 1;15(11):1311-1333. doi: 10.1101/gad.891601.
69. Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*. 2017 Apr 20;169(3):381-405. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.001.
70. Márquez J, de la Oliva AR, Matés JM, Segura JA, Alonso FJ. Glutaminase: a multifaceted protein not only involved in generating glutamate. *Neurochem Int*. 2006 May-Jun;48(6-7):465-471. doi: 10.1016/j.neuint.2005.10.015.

71. Martin M, Beauvoit B, Voisin PJ, Canioni P, Guérin B, Rigoulet M. Energetic and morphological plasticity of C6 glioma cells grown on 3-D support; effect of transient glutamine deprivation. *J Bioenerg Biomembr.* 1998 Dec;30(6):565-578.
72. Martín-Rufián M, Segura JA, Lobo C, Matés JM, Márquez J, Alonso FJ. Identification of genes downregulated in tumor cells expressing antisense glutaminase mRNA by differential display. *Cancer Biol Ther.* 2006 Jan;5(1):54-58.
73. Martín-Rufián M, Tosina M, Campos-Sandoval JA, Manzanares E, Lobo C, Segura JA, Alonso FJ, Matés JM, Márquez J. Mammalian glutaminase Gls2 gene encodes two functional alternative transcripts by a surrogate promoter usage mechanism. *PLoS One.* 2012;7(6):e38380. doi: 10.1371/journal.pone.0038380.
74. Martín-Rufián M, Nascimento-Gomes R, Higuero A, Crisma AR, Campos-Sandoval JA, Gómez-García MC, Cardona C, Cheng T, Lobo C, Segura JA, Alonso FJ, Szeliga M, Albrecht J, Curi R, Márquez J, Colquhoun A, Deberardinis RJ, Matés JM. Both GLS silencing and GLS2 overexpression synergize with oxidative stress against proliferation of glioma cells. *J Mol Med (Berl).* 2014 Mar;92(3):277-290. doi: 10.1007/s00109-013-1105-2.
75. Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD. Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science.* 1977 Mar 25;195(4284):1356-1358.
76. Matés JM, Segura JA, Martín-Rufián M, Campos-Sandoval JA, Alonso FJ, Márquez J. Glutaminase isoenzymes as key regulators in metabolic and oxidative stress against cancer. *Curr Mol Med.* 2013 May;13(4):514-534.
77. McCord M, Mukoyama YS, Gilbert MR, Jackson S. Targeting WNT Signaling for Multifaceted Glioblastoma Therapy. *Front Cell Neurosci.* 2017 Oct 13;11:318. doi: 10.3389/fncel.2017.00318. eCollection 2017.
78. Meertens LM, Miyata KS, Cechetto JD, Rachubinski RA, Capone JP. A mitochondrial ketogenic enzyme regulates its gene expression by association with the nuclear hormone receptor PPARalpha. *EMBO J.* 1998 Dec 1;17(23):6972-6978.
79. Michalak KP, Maćkowska-Kędziora A, Sobolewski B, Woźniak P. Key Roles of Glutamine Pathways in Reprogramming the Cancer Metabolism. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:964321. doi: 10.1155/2015/964321.

80. Mosavi LK, Cammett TJ, Desrosiers DC, Peng ZY. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci.* 2004 Jun;13(6):1435-1448.
81. Newsholme P, Procopio J, Lima MM, Pithon-Curi TC, Curi R. Glutamine and glutamate--their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem Funct.* 2003 Mar;21(1):1-9.
82. Nogueira L, Ruiz-Ontañón P, Vazquez-Barquero A, Moris F, Fernandez-Luna JL. The NF $\kappa$ B pathway: a therapeutic target in glioblastoma. *Oncotarget.* 2011 Aug;2(8):646-653.
83. Naugler WE, Karin M. NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms. *Curr Opin Genet Dev.* 2008 Feb;18(1):19-26. doi: 10.1016/j.gde.2008.01.020.
84. Nonoguchi N, Ohta T, Oh JE, Kim YH, Kleihues P, Ohgaki H. TERT promoter mutations in primary and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol.* 2013 Dec;126(6):931-937. doi: 10.1007/s00401-013-1163-0.
85. Norenberg MD, Martinez-Hernandez A. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.* 1979 Feb 2;161(2):303-310.
86. Notani D, Gottimukkala KP, Jayani RS, Limaye AS, Damle MV, Mehta S, Purbey PK, Joseph J, Galande S. Global regulator SATB1 recruits beta-catenin and regulates T(H)2 differentiation in Wnt-dependent manner. *PLoS Biol.* 2010 Jan 26;8(1):e1000296. doi: 10.1371/journal.pbio.1000296.
87. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lütolf UM, Kleihues P. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 2004 Oct 1;64(19):6892-6899. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1337.
88. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci.* 2009 Dec;100(12):2235-2241. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01308.x.
89. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007 May;170(5):1445-1453. doi: 10.2353/ajpath.2007.070011.
90. Olalla L, Aledo JC, Bannenberg G, Márquez J. The C-terminus of human glutaminase L mediates association with PDZ domain-containing proteins. *FEBS Lett.* 2001 Jan 19;488(3):116-122.

91. Olalla L, Gutiérrez A, Campos JA, Khan ZU, Alonso FJ, Segura JA, Márquez J, Aledo JC. Nuclear localization of L-type glutaminase in mammalian brain. *J Biol Chem*. 2002 Oct 11;277(41):38939-38944. doi: 10.1074/jbc.C200373200.
92. Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, Pekmezci M, Schwartzbaum JA, Turner MC, Walsh KM, Wrensch MR, Barnholtz-Sloan JS. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro Oncol*. 2014 Jul;16(7):896-913. doi: 10.1093/neuonc/nou087
93. Ostrom QT, Gittleman H, Stetson L, Virk SM, Barnholtz-Sloan JS. Epidemiology of gliomas. *Cancer Treat Res*. 2015;163:1-14. doi: 10.1007/978-3-319-12048-5\_1
94. Paul-Samojedny M, Suchanek R, Borkowska P, Pudełko A, Owczarek A, Kowalczyk M, Machnik G, Fila-Daniłow A, Kowalski J. Knockdown of AKT3 (PKB $\gamma$ ) and PI3KCA Suppresses Cell Viability and Proliferation and Induces the Apoptosis of Glioblastoma Multiforme T98G Cells. *Biomed Res Int*. 2014;2014:768181. doi: 10.1155/2014/768181.
95. Peng H, Ke XX, Hu R, Yang L, Cui H, Wei Y. Essential role of GATA3 in regulation of differentiation and cell proliferation in SK-N-SH neuroblastoma cells. *Mol Med Rep*. 2015 Feb;11(2):881-886. doi: 10.3892/mmr.2014.2809.
96. Perazzoli G, Prados J, Ortiz R, Caba O, Cabeza L, Berdasco M, González B, Melguizo C. Temozolomide Resistance in Glioblastoma Cell Lines: Implication of MGMT, MMR, P-Glycoprotein and CD133 Expression. *PLoS One*. 2015 Oct 8;10(10):e0140131. doi: 10.1371/journal.pone.0140131.
97. Pérez-Gómez C, Campos-Sandoval JA, Alonso FJ, Segura JA, Manzanares E, Ruiz-Sánchez P, González ME, Márquez J, Matés JM. Co-expression of glutaminase K and L isoenzymes in human tumour cells. *Biochem J*. 2005 Mar 15;386(Pt 3):535-542.
98. Pérez-Gómez C, Matés JM, Gómez-Fabre PM, del Castillo-Olivares A, Alonso FJ, Márquez J. Genomic organization and transcriptional analysis of the human l-glutaminase gene. *Biochem J*. 2003 Mar 15;370(Pt 3):771-784. doi: 10.1042/BJ20021445.
99. Polewski MD, Reveron-Thornton RF, Cherryholmes GA, Marinov GK, Cassady K, Aboody KS. Increased Expression of System xc<sup>-</sup> in Glioblastoma Confers an Altered Metabolic State and Temozolomide Resistance. *Mol Cancer Res*. 2016 Dec;14(12):1229-1242. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0028.

100. Porter LD, Ibrahim H, Taylor L, Curthoys NP. Complexity and species variation of the kidney-type glutaminase gene. *Physiol Genomics*. 2002;9(3):157-166. doi: 10.1152/physiolgenomics.00017.2002.
101. Ramão A, Gimenez M, Laure HJ, Izumi C, Vida RC, Oba-Shinjo S, Marie SK, Rosa JC. Changes in the expression of proteins associated with aerobic glycolysis and cell migration are involved in tumorigenic ability of two glioma cell lines. *Proteome Sci*. 2012 Sep 3;10(1):53. doi: 10.1186/1477-5956-10-53.
102. Rauch BH, Weber A, Braun M, Zimmermann N, Schrör K. PDGF-induced Akt phosphorylation does not activate NF-kappa B in human vascular smooth muscle cells and fibroblasts. *FEBS Lett*. 2000 Sep 8;481(1):3-7.
103. Reichel A, Begley DJ, Ermisch A. Changes in amino acid levels in rat plasma, cisternal cerebrospinal fluid, and brain tissue induced by intravenously infused arginine-vasopressin. *Peptides*. 1995;16(5):965-971.
104. Rocha CR, Kajitani GS, Quinet A, Fortunato RS, Menck CF. NRF2 and glutathione are key resistance mediators to temozolomide in glioma and melanoma cells. *Oncotarget*. 2016 Jul 26;7(30):48081-48092. doi: 10.18632/oncotarget.10129.
105. Schousboe A. Metabolic signaling in the brain and the role of astrocytes in control of glutamate and GABA neurotransmission. *Neurosci Lett*. 2018 Feb 2. pii: S0304-3940(18)30044-2. doi: 10.1016/j.neulet.2018.01.038.
106. Sidoryk M, Matyja E, Dybel A, Zielinska M, Bogucki J, Jaskólski DJ, Liberski PP, Kowalczyk P, Albrecht J. Increased expression of a glutamine transporter SNAT3 is a marker of malignant gliomas. *Neuroreport*. 2004 Mar 22;15(4):575-578.
107. Sonnewald U, Westergaard N, Schousboe A, Svendsen JS, Unsgård G, Petersen SB. Direct demonstration by [<sup>13</sup>C]NMR spectroscopy that glutamine from astrocytes is a precursor for GABA synthesis in neurons. *Neurochem Int*. 1993 Jan;22(1):19-29.
108. Sonoda Y, Ozawa T, Aldape KD, Deen DF, Berger MS, Pieper RO. Akt pathway activation converts anaplastic astrocytoma to glioblastoma multiforme in a human astrocyte model of glioma. *Cancer Res*. 2001 Sep 15;61(18):6674-6678.
109. Sonoda Y, Watanabe S, Matsumoto Y, Aizu-Yokota E, Kasahara T. FAK Is the Upstream Signal Protein of the Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Survival



- Pathway in Hydrogen Peroxide-induced Apoptosis of a Human Glioblastoma Cell Line. *J Biol Chem.* 1999 Apr 9;274(15):10566-10570.
110. Sontheimer H. A role for glutamate in growth and invasion of primary brain tumors. *J Neurochem.* 2008 Apr;105(2):287-295. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05301.x.
  111. Souba WW. Glutamine and cancer. *Ann Surg.* 1993 Dec;218(6):715-28.
  112. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):987-996. DOI: 10.1056/NEJMoa043330
  113. Sun M, Wang G, Paciga JE, Feldman RI, Yuan ZQ, Ma XL, Shelley SA, Jove R, Tsichlis PN, Nicosia SV, Cheng JQ. AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am J Pathol.* 2001 Aug;159(2):431-437.
  114. Suzuki Y, Shirai K, Oka K, Mobaraki A, Yoshida Y, Noda SE, Okamoto M, Suzuki Y, Itoh J, Itoh H, Ishiuchi S, Nakano T. Higher pAkt expression predicts a significant worse prognosis in glioblastomas. *J Radiat Res.* 2010;51(3):343-348.
  115. Szeliga M, Bogacińska-Karaś M, Kuźmich K, Rola R, Albrecht J. Downregulation of GLS2 in glioblastoma cells is related to DNA hypermethylation but not to the p53 status. *Mol Carcinog.* 2016 Sep;55(9):1309-1316. doi: 10.1002/mc.22372.
  116. Szeliga M, Bogacińska-Karaś M, Różycka A, Hilgier W, Marquez J, Albrecht J. Silencing of GLS and overexpression of GLS2 genes cooperate in decreasing the proliferation and viability of glioblastoma cells. *Tumour Biol.* 2014 Mar;35(3):1855-1862. doi: 10.1007/s13277-013-1247-4.
  117. Szeliga M, Matyja E, Obara M, Grajkowska W, Czernicki T, Albrecht J. Relative expression of mRNAs coding for glutaminase isoforms in CNS tissues and CNS tumors. *Neurochem Res.* 2008 May;33(5):808-813.
  118. Szeliga M, Obara-Michlewska M. Glutamine in neoplastic cells: focus on the expression and roles of glutaminases. *Neurochem Int.* 2009 Jul-Aug;55(1-3):71-75. doi: 10.1016/j.neuint.2009.01.008.

119. Szeliga M, Obara-Michlewska M, Matyja E, Łazarczyk M, Lobo C, Hilgier W, Alonso FJ, Márquez J, Albrecht J. Transfection with liver-type glutaminase cDNA alters gene expression and reduces survival, migration and proliferation of T98G glioma cells. *Glia*. 2009 Jul;57(9):1014-1023. doi: 10.1002/glia.20825.
120. Szeliga M, Sidoryk M, Matyja E, Kowalczyk P, Albrecht J. Lack of expression of the liver-type glutaminase (LGA) mRNA in human malignant gliomas. *Neurosci Lett*. 2005 Feb 21;374(3):171-173.
121. Szeliga M, Zgrzywa A, Obara-Michlewska M, Albrecht J. Transfection of a human glioblastoma cell line with liver-type glutaminase (LGA) down-regulates the expression of DNA-repair gene MGMT and sensitizes the cells to alkylating agents. *J Neurochem*. 2012 Nov;123(3):428-436. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07917.x.
122. Szerlip NJ, Pedraza A, Chakravarty D, Azim M, McGuire J, Fang Y, Ozawa T, Holland EC, Huse JT, Jhanwar S, Leversha MA, Mikkelsen T, Brennan CW. Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Feb 21;109(8):3041-3046. doi: 10.1073/pnas.1114033109.
123. Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, Villano JL. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014 Oct;23(10):1985-1996. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0275.
124. Turner A, McGivan JD. Glutaminase isoform expression in cell lines derived from human colorectal adenomas and carcinomas. *Biochem J*. 2003 Mar 1;370(Pt 2):403-408.
125. Ueki N, Nakazato M, Ohkawa T, Ikeda T, Amuro Y, Hada T, Higashino K. Excessive production of transforming growth-factor beta 1 can play an important role in the development of tumorigenesis by its action for angiogenesis: validity of neutralizing antibodies to block tumor growth. *Biochim Biophys Acta*. 1992 Oct 27;1137(2):189-196.
126. van Hamburg JP, de Bruijn MJ, Ribeiro de Almeida C, van Zwam M, van Meurs M, de Haas E, Boon L, Samsom JN, Hendriks RW. Enforced expression of GATA3 allows differentiation of IL-17-producing cells, but constrains Th17-

- mediated pathology. *Eur J Immunol.* 2008 Sep;38(9):2573-2586. doi: 10.1002/eji.200737840.
127. Velletri T, Romeo F, Tucci P, Peschiaroli A, Annicchiarico-Petruzzelli M, Niklison-Chirou MV, Amelio I, Knight RA, Mak TW, Melino G, Agostini M. GLS2 is transcriptionally regulated by p73 and contributes to neuronal differentiation. *Cell Cycle.* 2013 Nov 15;12(22):3564-3573. doi: 10.4161/cc.26771.
128. Vilhardt F, Haslund-Vinding J, Jaquet V, McBean G. Microglia antioxidant systems and redox signalling. *Br J Pharmacol.* 2017 Jun;174(12):1719-1732. doi: 10.1111/bph.13426.
129. Wang JB, Erickson JW, Fuji R, Ramachandran S, Gao P, Dinavahi R, Wilson KF, Ambrosio AL, Dias SM, Dang CV, Cerione RA. Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Cell.* 2010 Sep 14;18(3):207-219. doi: 10.1016/j.ccr.2010.08.009.
130. Weller M, Cloughesy T, Perry JR, Wick W. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma--are we there yet? *Neuro Oncol.* 2013 Jan;15(1):4-27. doi: 10.1093/neuonc/nos273.
131. Wesolowska A, Kwiatkowska A, Slomnicki L, Dembinski M, Master A, Sliwa M, Franciszkiewicz K, Chouaib S, Kaminska B. Microglia-derived TGF-beta as an important regulator of glioblastoma invasion--an inhibition of TGF-beta-dependent effects by shRNA against human TGF-beta type II receptor. *Oncogene.* 2008 Feb 7;27(7):918-930. doi: 10.1038/sj.onc.1210683
132. Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro Oncol.* 2002 Oct;4(4):278-299. doi: 10.1093/neuonc/4.4.278.
133. Xue L, Wang Y, Yue S, Zhang J. Low MiR-149 expression is associated with unfavorable prognosis and enhanced Akt/mTOR signaling in glioma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015 Sep 1;8(9):11178-11184.
134. Xu GY, McAdoo DJ, Hughes MG, Robak G, de Castro R Jr. Considerations in the determination by microdialysis of resting extracellular amino acid concentrations and release upon spinal cord injury. *Neuroscience.* 1998 Oct;86(3):1011-1021.
135. Yang G, Murashige DS, Humphrey SJ, James DE. A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation. *Cell Rep.* 2015 Aug 11;12(6):937-943. doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.016.

136. Ye ZC, Rothstein JD, Sontheimer H. Compromised glutamate transport in human glioma cells: reduction-mislocalization of sodium-dependent glutamate transporters and enhanced activity of cystine-glutamate exchange. *J Neurosci*. 1999 Dec 15;19(24):10767-10777.
137. Ye ZC, Sontheimer H. Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. *Cancer Res*. 1999 Sep 1;59(17):4383-4391.
138. Yoon NK, Maresh EL, Shen D, Elshimali Y, Apple S, Horvath S, Mah V, Bose S, Chia D, Chang HR, Goodglick L. Higher levels of GATA3 predict better survival in women with breast cancer. *Hum Pathol*. 2010 Dec;41(12):1794-1801. doi: 10.1016/j.humpath.2010.06.010.
139. Zeng Y, Wang X, Wang J, Yi R, Long H, Zhou M, Luo Q, Zhai Z, Song Y, Qi S. The tumorigenicity of glioblastoma cell line U87MG decreased during serial in vitro passage. *Cell Mol Neurobiol*. 2018 Aug;38(6):1245-1252. doi: 10.1007/s10571-018-0592-7.
140. Zhang J, Wang C, Chen M, Cao J, Zhong Y, Chen L, Shen HM, Xia D. Epigenetic silencing of glutaminase 2 in human liver and colon cancers. *BMC Cancer*. 2013 Dec 14;13:601. doi: 10.1186/1471-2407-13-601.
141. Zhu VF, Yang J, Lebrun DG, Li M. Understanding the role of cytokines in Glioblastoma Multiforme pathogenesis. *Cancer Lett*. 2012 Mar 28;316(2):139-150. doi: 10.1016/j.canlet.2011.11.001.
142. Zuccarini M, Giuliani P, Ziberi S, Carluccio M, Iorio PD, Caciagli F, Ciccarelli R. The Role of Wnt Signal in Glioblastoma Development and Progression: A Possible New Pharmacological Target for the Therapy of This Tumor. *Genes (Basel)*. 2018 Feb 17;9(2). pii: E105. doi: 10.3390/genes9020105.