

Monika Szeliga

**Glutaminazy w glejopochodnych komórkach  
nowotworowych.**

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem

Prof. dr hab. Jana Albrechta



ZS 291

H 4215

Zakład Neurotoksykologii

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. Mirosława Mossakowskiego

Polska Akademia Nauk

Warszawa 2008

Asi,

Z podziękowaniem za wszystkie chwile  
wspólnie spędzone nad tą pracą.

Serdecznie dziękuję mojemu Promotorowi,  
Panu Profesorowi dr hab. Janowi Albrechtowi,  
za inspirację i zaufanie, jakim mnie obdarzył  
powierając wykonanie przedstawionego w  
niniejszej pracy projektu oraz za pomoc i  
krytyczne uwagi w trakcie pisania pracy.

Pragnę wyrazić słowa najwyższego uznania dla mgr Marty Obary-Michlewskiej za pomoc i sugestie w trakcie wykonywania doświadczeń i pisania pracy, wsparcie psychiczne oraz anielską cierpliwość, z jaką odpowiadała na tysiące moich pytań.

Składam szczególne podziękowania Pani Profesor dr hab. Ewie Matyi za ogromną pracę włożoną w ocenę histopatologiczną materiału badawczego i wykonanie zdjęć preparatów mikroskopowych zamieszczonych w prezentowanej pracy.

Dziękuję Koleżankom i Kolegom z Zakładu Neurotoksykologii za życzliwość okazywaną mi przez ostatnie cztery lata.

Dziękuję także Eli Grzywaczewskiej i mgr Marzenie Łazarczyk za pomoc przy wykonywaniu testów proliferacji i migracji oraz Zespołowi Pracowni Biologii Molekularnej za możliwość korzystania z zaplecza technicznego Pracowni.

Serdecznie dziękuję Rodzinie i Przyjaciołom za słowa otuchy.

Dziękuję Profesorowi dr Javierowi Marquezowi, dr Carolinie Lobo oraz Zespołowi Zakładu Biologii Molekularnej i Biochemii Uniwersytetu w Maladze za umożliwienie przeprowadzenia transfekcji komórek, podzielenie się ogromnym doświadczeniem naukowym i ciepłe przyjęcie w Waszym Zespole.

I would like to thank Professor dr Javier Marquez, dr Carolina Lobo and all Members of the Department of Molecular Biology and Biochemistry of the University of Malaga not only for advices and helpul discussions on scientific topics, but also for support during my stay in Malaga. It has been a great pleasure working with you.

Wyniki zamieszczone w niniejszej rozprawie zostały częściowo opublikowane w następujących pracach:

1. **Szeliga M**, Sidoryk M, Matyja E, Kowalczyk P, Albrecht J. (2005) Lack of expression of the liver-type glutaminase (LGA) mRNA in human malignant gliomas. *Neurosci Lett* 374:171-173.
2. **Szeliga M**, Matyja E, Obara M, Grajkowska W, Czernicki T, Albrecht J. (2008) Relative Expression of mRNAs Coding for Glutaminase Isoforms in CNS Tissues and CNS Tumors. *Neurochem Res* 33:808-813.

Badania, których wyniki przedstawiono w niniejszej pracy były częściowo finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach grantu 2PO5A 08930 oraz przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej.

<i>I. Wykaz skrótów stosowanych w pracy</i> .....	3
<i>II. Wstęp</i> .....	7
II.1. Nowotwory pochodzenia glejowego (glejaki): biologia i klasyfikacja .....	7
II.2. Glutamina .....	12
II.2.1. Występowanie, funkcje i metabolizm glutaminy w ogólnym zarysie .....	12
II.2.2. Glutamina w ośrodkowym układzie nerwowym .....	13
II.2.3. Glutamina a procesy nowotworzenia .....	14
II.2.4. Swoiste role glutaminy w glejakiach.....	15
II.2.5. Glutamina a ekspresja genów w tkankach obwodowych .....	15
II.3. Glutaminaza.....	16
II.3.1. Glutaminaza typu nerkowego .....	16
II.3.2. Glutaminaza typu wątrobowego .....	19
II.3.3. LGA jako czynnik transkrypcyjny .....	20
II.3.4. Glutaminazy w nowotworach.....	22
<i>III. Cel pracy</i> .....	25
<i>IV. Materiały i metody</i> .....	26
IV.1. Materiał biopsyjny .....	26
IV.2. Linia komórkowa glejaka ludzkiego T98G .....	27
IV.3. Hodowle pierwotne szczurzych astrocytów .....	27
IV.4. Hodowle pierwotne szczurzych neuronów.....	28
IV.5. Wektory pcDNA i pLGA.....	28
IV.6. Izolacja RNA .....	28
IV.7. Reakcja odwrotnej transkrypcji.....	29
IV.8. Reakcja łańcuchowa polimerazy .....	30
IV.9. Elektroforeza w żelu agarozowym .....	31
IV.10. Sekwencjonowanie produktów PCR.....	32
IV.11. Transfekcja komórek linii T98G .....	32
IV.12. Test MTT .....	33
IV.13. Test proliferacji.....	33
IV.14. Test formowania kolonii.....	34
IV.15. Test migracji.....	34
IV.16. Analiza ekspresji genów metodą mikromacierzy DNA .....	34

IV.17. Analiza ekspresji genów metodą PCR w czasie rzeczywistym.....	35
IV.18. Metody statystyczne.....	35
<b>V. Wyniki.....</b>	<b>37</b>
V.1. Ekspresja GA w guzach mózgu.....	37
V.1.1. Ekspresja izoform glutaminazy w glioblastoma i anaplastic astrocytoma oraz w przerzutach nowotworów narządów obwodowych do mózgu.....	37
V.1.2. Ekspresja izoform glutaminazy w guzach mózgu o różnym stopniu złośliwości i różnym pochodzeniu .....	38
V.2. Ekspresja izoform glutaminazy w szczurzych astrocytach i neuronach .....	43
V.3. Transfekcja komórek linii glejaka ludzkiego T98G.....	44
V.4. Wpływ transfekcji sekwencją kodującą LGA na wzrost i przeżywalność oraz zdolności migracyjne komórek linii T98G .....	44
V.4.2. Test formowania kolonii .....	46
V.4.3. Przeżywalność komórek.....	47
V.6. Wpływ transfekcji sekwencją kodującą LGA na ekspresję genów w komórkach linii T98G .....	49
V.6.2. Analiza ekspresji genów metodą real-time PCR .....	55
<b>VI. Dyskusja .....</b>	<b>60</b>
VI.1. Zaburzenia w ekspresji LGA i GAC w glejakach o najwyższym stopniu złośliwości .	60
VI.2. Zaburzenia w ekspresji LGA w guzach OUN o niższych stopniach złośliwości i różnym pochodzeniu .....	61
VI.3. Ekspresja izoform GA w szczurzych astrocytach i neuronach pochodzących z hodowli pierwotnych .....	61
VI.4. Wpływ LGA na proliferację, przeżywalność i zdolności migracyjne komórek glioblastoma in vitro.....	62
VI.5. Wpływ LGA na ekspresję genów w komórkach glioblastoma in vitro.....	63
VI.6. LGA jako czynnik transkrypcyjny?.....	65
VI.7. Dalsze ścieżki badawcze .....	66
<b>VII. Wnioski.....</b>	<b>68</b>
<b>VIII. Streszczenie.....</b>	<b>69</b>
<b>IX. Literatura .....</b>	<b>73</b>



**I. Wykaz skrótów stosowanych w pracy**

AA	gwiazdziak anaplastyczny, <i>ang. anaplastic astrocytoma</i> , WHO III
ACTB	$\beta$ -aktyna
AD	gwiazdziak rozlany, <i>ang. diffuse astrocytoma</i> , WHO II
ADM	adrenomedulina
AMPA	kwasi $\alpha$ -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy, <i>ang. <math>\alpha</math>-amino-3-hydroksy-5-methyl-4-isoxazole-propionate</i>
ANCO	rodzina regulatorów transkrypcji zawierających powtórzenia ankirynowe, <i>ang. ankyrin repeats-containing cofactors</i>
ANOVA	test statystyczny, <i>ang. analysis of variance</i>
AP	gwiazdziak włosowatokomórkowy, <i>ang. pilocytic astrocytoma</i> , WHO I
ATCC	bank hodowli komórkowych, <i>ang. American Tissue Culture Collection</i>
ATP7B	podjednostka $\beta$ ATPazy7
Bcl-2	białko antyapoptotyczne
BLAST	program komputerowy służący do porównywania sekwencji, <i>ang. Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	albumina surowicy bydłej, <i>ang. bovine serum albumin</i>
CAPN1, 2	białka z grupy kalpain
CD95	marker apoptotyczny
CDKN2A/B	inhibitory kinaz cyklinozależnych, <i>ang. cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
cDNA	komplementarny DNA, <i>ang. complementary DNA</i>
c-Fos, c-Jun	protoonkogenne czynniki transkrypcyjne
COL1A2, COL8A2	białka z rodziny kolagenów
cRNA	komplementarny RNA, <i>ang. complementary RNA</i>
CTC	pojedyncze krążących we krwi komórki nowotworowe, <i>ang. Circulating Tumor Cells</i>
CTGF	cytokina, <i>ang. connective tissue growth factor</i>
DEPC	dwuetylopirowęglan, <i>ang. diethylpyrocarbonate</i>
DMEM	pożywka do hodowli komórkowych, <i>ang. Dulbecco's modified Eagle's medium</i>

---

DNA	kwasy deoksyrybonukleinowy, <i>ang. deoxyribonucleic acid</i>
DNaza	deoksyrybonukleaza
dNTP	trójfosforan deoksyrybonukleozydu, <i>ang. deoxyribonucleoside triphosphate</i>
DYNC1LI1	podjednostka dyneiny
EATC	mysia linia komórkowa wyprowadzona z gruczolakoraka Ehrlicha, <i>ang. Ehrlich ascites tumor cells</i>
EATC-KGA	komórki linii EATC z zablokowaną ekspresją KGA
EDTA	kwasy etylenodiaminotetraoctowy, <i>ang. ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGFR	receptor nabłonkowego czynnika wzrostu, <i>ang. epidermal growth factor receptor</i>
ERK	kinaza regulowana przez sygnał pozakomórkowy, <i>ang. extracellular signal-regulated protein kinase</i>
ESMV	sekwencja glutaminian-seryna-metionina-walina
FBS	plodowa surowica bydlęca, <i>ang. fetal bovine serum</i>
FNDC1	białko błonowe zawierające domeny fibronektynowe, <i>ang. fibronectin type III domain containing 3B</i>
G418	genetycyna
GA	glutaminaza aktywowana fosforanem, <i>ang. phosphate activated glutaminase</i>
GABA	kwasy $\gamma$ -aminomasłowy, <i>ang. <math>\gamma</math>-aminobutyric acid</i>
GAC	izoforma KGA różniąca się sekwencją w C-końcu
GAM	izoforma KGA ulegająca ekspresji w mięśniach
GAPDH	dehydrogenaza aldehydu-3-fosfoglicerynowego, <i>ang. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GATA3	czynnik transkrypcyjny z rodziny GATA
GBM	glejak wielopostaciowy, <i>ang. glioblastoma</i> , WHO IV
GIP	białko oddziałujące z glutaminazą, <i>ang. Glutaminase Interacting Protein</i>
Gln	glutamina
Glu	kwasy glutaminowy
GS	syntetaza glutaminy, <i>ang. glutamine synthetase</i>

GSH	glutathion
HepG2	linia komórkowa wyprowadzona z ludzkiego raka wątroby
HSP70, HSP72	białka szoku cieplnego, <i>ang. heat-shock protein</i>
IFN $\alpha$ , $\gamma$	białka należące do rodziny interferonów
IP	indeks proliferacji, <i>ang. proliferation index</i>
JNK	białkowa kinaza JUN, <i>ang. c-JUN N-terminal kinase</i>
KGA	glutaminaza typu nerkowego, <i>ang. kidney-type glutaminase</i>
Km	stała Michaelisa
LGA	glutaminaza typu wątrobowego, <i>ang. liver-type glutaminase</i>
LGDLL	sekwencja leucyna-glicyna-asparaginian-leucyna-leucyna
MAX	białko z rodziny czynników transkrypcyjnych MYC, <i>ang. MYC associated factor X</i>
MCF-7	linia komórkowa wyprowadzona z ludzkiego gruczolakoraka piersi
MDM2	protoonkogen, ligaza ubikwitynująca białko supresorowe TP53, <i>ang. murine double minute 2</i>
MEM	pożywka do hodowli komórkowych, <i>ang. Minimal Essential Medium</i>
MGMT	metylotransferaza DNA O <sup>6</sup> metyloguaniny, <i>ang. O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase</i>
mRNA	informacyjny RNA, <i>ang. messenger RNA</i>
mTOR	wrażliwa na rapamycynę kinaza serynowo-treoninowa, <i>ang. mammalian Target of Rapamycin</i>
MTT	bromek 3-(4,5-dimetylo 2-tiazolylo)-2,5-difenylo-tetrazolowy, <i>ang. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)</i>
NMDA	N-metylo-D-asparaginian, <i>ang. N-methyl-D-aspartate</i>
OD	gęstość optyczna, <i>ang. optical density</i>
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PARP11	białko z rodziny polimeraz poli(ADP-rybozy), <i>ang. poly (ADP-ribose) polymerase family, member 11</i>
PBS	buforowana sól fizjologiczna, <i>ang. phosphate-buffered saline</i>
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy, <i>ang. polymerase chain reaction</i>

PDZ	domena częsta w białkach sygnałowych, <i>ang. Postsynaptic density protein-95/Discs large/Zona occludens-1</i>
PFA	paraformaldehyd
pLGA	wektor pcDNA3 zawierający sekwencję kodującą ludzką LGA
Pz	pary zasad
RB	supresor nowotworowy RB, <i>ang. retinoblastoma</i>
RNA	kwas rybonukleinowy
RNaza	rybonukleaza
RT	temperatura pokojowa, <i>ang. room temperature</i>
RT-PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy poprzedzona reakcją odwrotnej transkrypcji, <i>ang. reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
S100A16	białko z rodziny markerów astrocytarnych
SD	odchylenie standardowe, <i>ang. standard deviation</i>
SEGA	podwysięciółkowy gwiazdziak olbrzymiokomórkowy, <i>ang. subependymal giant cell astrocytoma, WHO I</i>
SNT	$\alpha$ -1-syntropina, <i>ang. <math>\alpha</math>-1-syntrophin</i>
Sp1, Sp3	czynniki transkrypcyjne z rodziny Sp
T98G	linia komórkowa wyprowadzona z glejaka ludzkiego
TBE	bufor do elektroforezy DNA: tris-boran-EDTA, <i>ang. tris-borate-EDTA</i>
TGF $\beta$	transformujący czynnik wzrostu, <i>ang. transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TIMP1, TIMP4	białka z rodziny inhibitorów metaloproteinaz, <i>ang. tissue inhibitor of matrix metalloproteinase</i>
TLGA	linia T98G transfekowana wektorem pLGA zawierającym sekwencję kodującą ludzką LGA
TNF- $\alpha$	czynnik martwicy nowotworu, <i>ang. tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
TP53	supresor nowotworowy TP53
TpcDNA	linia T98G transfekowana pustym wektorem pcDNA3
TSE	linia komórkowa wyprowadzona z ludzkiego raka piersi
VAMP8	endobrewina, <i>ang. vesicle-associated membrane protein 8</i>
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia, <i>ang. World Health Organization</i>
ZR-75	linia komórkowa wyprowadzona z ludzkiego raka piersi

## II. Wstęp

### II.1. Nowotwory pochodzenia glejowego (glejaki): biologia i klasyfikacja

Glejaki są nowotworami pochodzenia astrocytarnego, oligodendroglejowego lub ependymalnego i stanowią ponad 70% wszystkich guzów mózgu (Oghaki i Kleihues, 2005). Dane epidemiologiczne wskazują na szereg czynników potencjalnie związanych z powstawaniem glejaków, przy czym są to głównie czynniki ogólnie uznane za kancerogenne (m. in.: kontakt z materiałami plastikowymi, gumowymi i odczynnikami chemicznymi, promieniowanie rentgenowskie). Postuluje się również wpływ różnych czynników immunologicznych, pola elektromagnetycznego i urazów głowy, a także podłoża genetycznego. Do tej pory nie ma jednak dowodów jednoznacznie wskazujących na związek pomiędzy którymkolwiek z wymienionych czynników a etiologią glejaków (Oghaki i Kleihues, 2005).

W Tabeli II.1. przedstawiono uproszczony podział glejaków sporządzony w oparciu o najnowsza klasyfikację WHO (Louis i wsp., 2007), obejmujący tylko te typy guzów, które stanowiły materiał badawczy prezentowanej pracy. Podstawowe kryterium klasyfikacji WHO stanowią cechy histologiczne guza. Poszczególnym typom guzów przypisuje się stopnie złośliwości od I do IV (WHO grade I-IV). Stopień I odnosi się do guzów o niskim potencjale proliferacyjnym, których operacyjne usunięcie kończy się powodzeniem. Stopień II obejmuje guzy o niskim potencjale proliferacyjnym, ale ze względu na zdolność do infiltracji (naciekania zdrowych obszarów mózgu) często nawracające po operacji. Stopień III odnosi się do guzów wykazujących histologiczne cechy złośliwości, atypię jądrową i dużą aktywność mitotyczną. Leczenie guzów o III stopniu złośliwości obejmuje z reguły radio- i/lub chemioterapię. Stopień IV oznacza nowotwory o najgorszych rokowaniach terapeutycznych, wykazujące atypię jądrową i aktywność mitotyczną, wysoki stopień proliferacji, zdolność do infiltracji, a także ogniska martwicy (Louis i wsp., 2007).

Zdolność do naciekania zdrowych tkanek jest jedną z głównych przyczyn porażek w leczeniu glejaków: nawet bardzo dokładna resekcja guza staje się nieskuteczna w przypadku zjawiska infiltracji (Merlo, 2003). Ponadto glejaki charakteryzuje wysoka oporność na radio- i chemioterapię, co ma prawdopodobnie związek z ich obniżoną wrażliwością na bodźce apoptotyczne (Giese, 2003; Giese i wsp., 2003; Merlo, 2003). Poznanie molekularnych

procesów związanych z rozwojem glejaków mogłoby zatem przynieść przełom w leczeniu tych guzów.

**Tabela II.1. Uproszczona klasyfikacja glejaków.**

Nazwa polska	Nazwa angielska	Stopień złośliwości wg WHO
<i>Guzy pochodzenia astrocytarnego</i>		
Podwyściółkowy gwiazdziak olbrzymiokomórkowy	Subependymal giant cell astrocytoma (SEGA)	I
Gwiazdziak włosowatokomórkowy	Pilocytic astrocytoma	I
Gwiazdziak rozlany	Diffuse astrocytoma	II
Gwiazdziak anaplastyczny	Anaplastic astrocytoma	III
Glejak wielopostaciowy	Glioblastoma	IV
<i>Guzy pochodzenia oligodendroglejowego</i>		
Skąpodrzewiak	Oligodendroglioma	II
Skąpodrzewiak anaplastyczny	Anaplastic oligodendroglioma	III
<i>Guzy pochodzenia ependymalnego</i>		
Wyściółczak	Ependymoma	II
Wyściółczak anaplastyczny	Anaplastic ependymoma	III
<i>Guzy neuronalno-glejowe</i>		
Zwojakoglejak	Ganglioglioma	I
Zwojakoglejak anaplastyczny	Anaplastic ganglioglioma	III

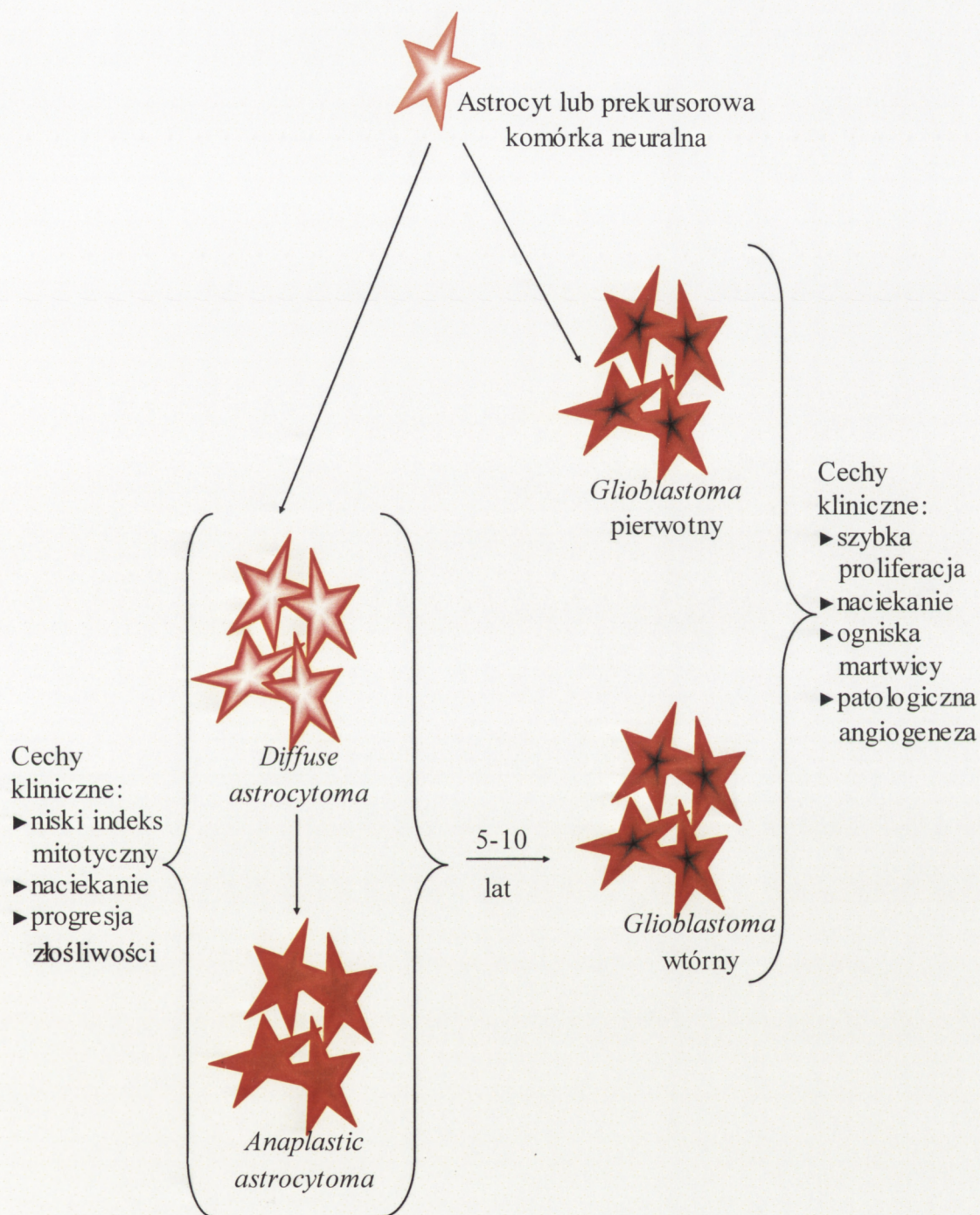
Wg Louis i wsp., 2007, zmodyfikowane.

Istnieją dwie hipotezy dotyczące powstawania glejaków (Maher i wsp., 2001):

- ▶ transformacji nowotworowej podlegają neuralne komórki macierzyste lub progenitorowe komórki glejowe; mutacja zachodząca w DNA takich komórek stymuluje je do migracji do dowolnego rejonu mózgu, gdzie na skutek kolejnych mutacji komórki te podlegają pełnej transformacji nowotworowej;

- ▶ źródłem transformowanego nowotworowo gleju są dojrzałe astrocyty lub oligodendrocyty, które na skutek mutacji uległy ponownemu odróżnicowaniu do komórek gleju gwiaździstego odzyskując pełne zdolności proliferacyjne i migracyjne.

Istotnym zagadnieniem jest proces progresji glejaków: *glioblastoma* (GBM, WHO IV) rozwijają się z *astrocytoma* o niższych stopniach złośliwości i są wtedy określane jako glejaki wielopostaciowe wtórne (ang. *secondary glioblastoma*) w odróżnieniu od glejaków wielopostaciowych pierwotnych (ang. *primary glioblastoma*) powstających *de novo* (Maher i wsp., 2001; Oghaki i Kleihues, 2007) (Ryc. II.1.). *Glioblastoma* pierwotne charakteryzują się krótkim i gwałtownym przebiegiem klinicznym i już w pierwszej biopsji wykazują cechy histologiczne właściwe dla tego typu nowotworów (Maher i wsp., 2001; Oghaki i Kleihues, 2007). Badania populacyjne wykazały, że wtórne *glioblastoma* stanowią zaledwie około 5% glejaków (Oghaki i Kleihues, 2007), natomiast *diffuse astrocytoma* (AD, WHO II), podobnie jak *anaplastic astrocytoma* (AA, WHO III) – około 10-15% (Okamoto i wsp., 2004, Oghaki i Kleihues, 2007). Przewaga liczebna pacjentów z guzami o niższym stopniu złośliwości wynika prawdopodobnie z faktu, że wielu z nich umiera zanim nastąpi progresja. Możliwe również, że niektóre przypadki *glioblastoma*, pomimo wywodzenia się z guzów o niższym stopniu złośliwości zostały ze względu na gwałtowny przebieg progresji błędnie zakwalifikowane jako *glioblastoma* pierwotne (Oghaki i Kleihues, 2007). Pacjenci z wtórnymi *glioblastoma* przeżywają z reguły dłużej, niż pacjenci z *glioblastoma* pierwotnymi, jednak to zjawisko może być konsekwencją młodszego wieku chorych, a nie istotnych różnic w cechach biologicznych tych guzów (Oghaki i Kleihues, 2007). Wykazano, że *glioblastoma* pierwotne rozwijają się częściej u mężczyzn, a wtórne - u kobiet. Jednocześnie glejaki o niższych stopniach złośliwości występują tak samo często u pacjentów obu płci lub nieznacznie częściej u mężczyzn – możliwe zatem, że progresja do wtórnych *glioblastoma* następuje gwałtowniej lub częściej u kobiet niż u mężczyzn (Oghaki i Kleihues, 2007, odnośniki literaturowe tamże).



**Ryc. II.1.: Dwie drogi powstawania glejaków.** Na podstawie Maher i wsp., 2001; Ohgaki i Kleihues, 2007, zmodyfikowane.

Wykazano szereg różnic molekularnych między *glioblastoma* pierwotnymi i wtórnymi (Maher i wsp., 2001; van den Boom i wsp., 2003; Ohgaki i Kleihues, 2007) oraz między *glioblastoma* a poszczególnymi typami *astrocytoma* (Tab. II.2.).



**Tab. II.2. Glejaki o różnym stopniu złośliwości i pochodzeniu: przeżywalność pacjentów oraz najczęstsze mutacje i abberacje chromosomowe.**

Guz	Stopień złośliwości wg WHO	Przeżycie pacjentów po 5 latach	Najczęściej występujące mutacje i abberacje chromosomowe
Pilocytic astrocytoma	I	89%-100%	Mutacja: <i>TP53</i>
Diffuse astrocytoma	II	45%-58%	Mutacja: <i>TP53</i> (59%); delecja: 17p; amplifikacja: 7 lub 7q
Anaplastic astrocytoma	III	11%-28%	Mutacja: <i>TP53</i> (53%); delecja: 17p, <i>CDKN2A</i> , <i>RBI</i> ; amplifikacja: 7 lub 7q,
Glioblastoma pierwotny	IV	1.2%-2.9% (średnio: 4.7 miesiąca)	Delecja: 10q (70%), <i>CDKN2A</i> (31%), <i>RBI</i> ; mutacja: <i>TP53</i> (28%) <i>PTEN</i> (25%); amplifikacja: <i>EGFR</i> (36%), <i>MDM2</i> (7%)
Glioblastoma wtórny	IV	1.2%-2.9% (średnio: 7.8 miesiąca)	Delecja: 10q (63%); delecja: <i>CDKN2A</i> (19%), <i>RB</i> ; mutacja: <i>TP53</i> (65%), <i>PTEN</i> (4%); amplifikacja: <i>EGFR</i> (8%)
Oligodendroglioma	II	66%-78%	Delecja: 1p i/lub 19q (80%), metylacja: <i>CDKN2A/B</i>
Anaplastic oligodendroglioma	III	30%-38%	Delecja: 1p i/lub 19q (50%); 9p; metylacja <i>RBI</i> , <i>CDKN2A/B</i> (15%); mutacja: <i>TP53</i> (10%-15%), <i>PTEN</i> (10%)
Ependymoma	II/III	66%	Amplifikacja 7 lub 7q, 9 (15%), 12, 15q; delecja 10 (9%-19%), 22q (20%-26%)

Wg Biernat, 1999; Hirose i wsp., 2001; Ohgaki, 2005; Ohgaki i Kleihues, 2005; 2007; Biernat i Zawrocki, 2007; Gresner i Liberski, 2007.

Mimo postępu medycyny i służących jej nauk podstawowych, glejaki nadal stanowią ogromne wyzwanie terapeutyczne. Przeżywalność pacjentów z glejakami jest niska (Ohgaki i Kleihues, 2005; Louis i esp., 2007), a dokładne dane przedstawia Tabela II.2. Należy

zaznaczyć, że stosowana klasyfikacja WHO wykorzystuje subiektywną ocenę cech histopatologicznych guza, która może prowadzić do błędnych wniosków diagnostycznych. Między innymi z tego względu prowadzone są badania nad molekularnymi markerami glejaków – wydaje się, że znalezienie obiektywnego kryterium oceny złośliwości ułatwi weryfikację diagnostyczną przypadków i - w konsekwencji - dobór właściwej terapii.

Niestety, glejaki są guzami bardzo heterogennymi pod względem molekularnym: dotychczas zidentyfikowano szereg zaburzeń molekularnych (mutacji genetycznych, zmian w poziomie metylacji promotorów genów, zmian w poziomie ekspresji genów) i/lub aberracji chromosomowych występujących u pacjentów z poszczególnymi typami glejaków (Tab. II.2.). Żadna z tych cech nie jest jednak specyficzna dla danego typu glejaka (Biernat i wsp., 1997; van den Boom i wsp., 2003; Ohgaki, 2005; Ohgaki i Kleihues, 2007; Gresner i Liberski, 2007). O wysokiej heterogenności glejaków dodatkowo świadczy różnorodność genów ulegających ekspresji w obrębie jednego guza (Holland, 2000).

## **II.2. Glutamina**

### **II.2.1. Występowanie, funkcje i metabolizm glutaminy w ogólnym zarysie**

Glutamina (Gln) jest najbardziej rozpowszechnionym aminokwasem w organizmie (Souba, 1993; Newsholme i wsp., 2003). Jej stężenie w zdrowej tkance utrzymywane jest na stałym poziomie i wynosi – w zależności od tkanki - od 0.6-0.9 mM do 20 mM (Souba, 1993).

Funkcje, jakie Gln pełni w organizmie są bardzo liczne i różnorodne. Aminokwas ten jest istotnym źródłem energii dla wielu typów komórek, przede wszystkim intensywnie dzielących się limfocytów, makrofagów, neutrofilii i enterocytów (Chang i wsp., 1999; Curi i wsp., 1999; Newsholme i wsp., 1999).

Gln stanowi substrat do syntezy nukleotydów (Boza i wsp., 2000) i białek, przy czym wykazano, że nieprawidłowa liczba reszt glutaminowych w łańcuchu polipeptydowym powoduje zaburzone fałdowanie białka i agregację prowadząc do różnych chorób neurodegeneracyjnych (Satyal i wsp., 2000), na przykład do choroby Huntingtona (Carmichael i wsp., 2000).

Gln jest także prekursorem glutaminianu (Glu) i glutationu (GSH) (Collins i wsp., 1998; Babu i wsp., 2001) oraz azotu i szkieletów węglowych (Kovacevic i McGivan, 1983). GSH uznawany jest za jeden z ważniejszych przeciwutleniaczy w komórce, a zatem Gln pośrednio ochrania przed skutkami stresu oksydacyjnego (Amores-Sanchez i Medina, 1999).

Ze względu na tematykę prezentowanej pracy, poniżej przedstawiono rolę glutaminy w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), komórkach nowotworowych, w szczególności – w glejakach, a także dane dotyczące roli glutaminy w regulacji procesów transkrypcji różnych genów.

### ***II.2.2. Glutamina w ośrodkowym układzie nerwowym***

Istotną funkcją pełnioną przez Gln w OUN jest udział w metabolizmie amoniaku i syntezie neuroprzekazników aminokwasowych: pobudzającego kwasu glutaminowego (Glu), oraz hamującego – kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA).

Synteza Gln z Glu i amoniaku umożliwia neutralizację tego ostatniego, przy czym reakcja ta katalizowana jest przez syntetazę glutaminy (GS) i zachodzi wyłącznie w astrocytach (Norenberg, 1979; Norenberg i Martinez – Hernandez, 1979). Gln transportowana jest do neuronów, gdzie pod wpływem aktywowanej fosforanem glutaminazy (GA) ulega hydrolizie do Glu (Laake i wsp., 1995). Reakcja dekarboksylacji Glu prowadzi do tworzenia się GABA (Sonnewald i wsp., 1993). Uwolniony z neuronalnych zakończeń presynaptycznych Glu jest wychwytywany przez astrocyty, w których ulega metabolizmowi do Gln, co zamyka cykl Gln-Glu.

W transporcie Gln pomiędzy astrocytami i neuronami bierze udział szereg transporterów błonowych należących do układów A, ASC, N, L, różniących się między sobą swoistością aminokwasową, zależnością od pH i wymogami względem jonów (Palacin i wsp., 1998; Bode, 2001).

Nadmiar Gln jest częściowo wyprowadzany przez barierę krew-mózg, a proces ten również jest aktywny i angażuje białka transporterowe (Xiang et al., 2003).

### II.2.3. Glutamina a procesy nowotworzenia

Glutamina jest podstawowym źródłem energii dla komórek nowotworowych o różnej histogenezie (Souba, 1993 i odnośniki literaturowe tamże) konkurujących z komórkami organizmu gospodarza o ten aminokwas (Medina i wsp., 1992). Badania na myszach, którym wszczepiono komórki nowotworowe linii EATC wykazały przepływ glutaminy z komórek myszy do komórek guza (Carrascosa i wsp., 1984; Marquez i Nunez de Castro, 1991). Także inkubacja *in vitro* komórek EATC z glutaminą jako jedynym źródłem energii i azotu powodowała jej napływ do komórek, gdzie następowała reakcja hydrolizy glutaminy do glutaminianu kumulowanego w komórkach i jonów amonowych usuwanych na zewnątrz komórek (Carrascosa i wsp., 1984).

Istnieje szereg danych wskazujących na bezpośredni związek między obecnością glutaminy w pożywce a następującymi cechami charakterystycznymi dla nowotworów:

- ▶ intensywnością proliferacji komórek różnych linii nowotworowych (Turowski i wsp., 1994; Wasa i wsp., 1996; Pawlik i wsp., 2000);
- ▶ adhezyjnością komórek (Turowski i wsp., 1994);
- ▶ poziomem syntezy DNA i białek (Wasa i wsp., 1996; Spittler i wsp., 1997).

Zaobserwowano także odwrotnie proporcjonalną zależność między stężeniem Gln a stopniem zróżnicowania komórek (Turowski i wsp., 1994; Spittler i wsp., 1997). Gln działa antyapoptotycznie, prawdopodobnie niezależnie od sposobu zaindukowania procesu apoptozy (Xu i wsp., 1997; Santoso i wsp., 1998).

Konsekwencją wysokiego zapotrzebowania komórek nowotworowych na Gln jest intensywny, podwyższony w stosunku do komórek prawidłowych transport tego aminokwasu (Souba, 1993; Wasa i wsp., 1996). Istnieją doniesienia dokumentujące nadekspresję transportera Gln, ASCT2, w komórkach nowotworowych (Bode i wsp., 2002; Witte i wsp., 2002).

#### **II.2.4. Swoiste role glutaminy w glejakach**

Podobnie jak w innych guzach, także w glejakach glutamina odgrywa - bezpośrednio lub pośrednio, jako prekursor innych związków - szereg istotnych funkcji: jest oczywiście głównym metabolitem energetycznym (Dranoff i wsp., 1985; Martin i wsp., 1998). Aminokwas ten bierze także udział w regulacji objętości komórek linii glejaka (Ernest i Sontheimer, 2007). Ponadto powstający z glutaminy glutaminian gromadzi się w przestrzeni międzykomórkowej w stężeniu działającym neurotoksycznie na komórki otaczające guz. Tak wysokie stężenie glutaminianu spowodowane jest zwiększonym wyrzutem (Ye i Sontheimer, 1999) i/lub zmniejszonym wychwytem zwrotnym tego aminokwasu (Ye i wsp., 1999; Takano i wsp., 2001), co wynika z zaburzeń ekspresji transportera i/lub jego translokacji z błony komórkowej do wnętrza komórki (Ye i Sontheimer, 1999; Ye i wsp., 1999). Konsekwencją uwalniania dużych ilości glutaminianu jest intensywny wzrost i migracja glejaków (Takano i wsp., 2001), który można zahamować stosując blokery receptorów glutaminianu: NMDA (receptory N-metylo-D-asparaginianowe) i AMPA (receptory a-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowe) (Rzeski i wsp., 2001; Takano i wsp., 2001; Ishiuchi i wsp., 2002). W glejakach następuje także intensywna produkcja GSH (Portais i wsp., 1999), w dużym stopniu odpowiedzialnego za oporność tych guzów na radio- i chemioterapię (Grant i Ironside, 1995; Merlo, 2003).

Podobnie jak w innych komórkach nowotworowych, także w komórkach glejaków wykazano nadekspresję transportera ASCT2 (Dolińska wsp., 2003; Sidoryk i wsp., 2004).

#### **II.2.5. Glutamina a ekspresja genów w tkankach obwodowych**

Coraz więcej przesłanek sugeruje, że Gln moduluje ekspresję genów w różnych tkankach. Wykazano wpływ Gln na wzrost ekspresji białek szoku cieplnego w ludzkich komórkach krwi obwodowej (Wischmeyer i wsp., 2003) i w różnych tkankach szczurów poddawanych działaniom endotoksyn (Wischmeyer i wsp., 1999). W szczurzych neutrofilach i ludzkich komórkach krwi obwodowej (Wischmeyer i wsp., 2003) poddawanych działaniu endotoksyn (Pithon-Curi i wsp., 2002) Gln obniża ekspresję TNF- $\alpha$ . Obniżeniu ekspresji TNF- $\alpha$  w komórkach krwi towarzyszy wzrost ekspresji indukowanego białka HSP72, natomiast nie zmienia się poziom ekspresji konstytutywnego białka HSC73, co sugeruje wpływ Gln na ekspresję genów związanych z odpowiedzią komórki na stres (Wischmeyer i

wsp., 2003). Także w szczurzych enterocytach poddanych stresowi cieplnemu glutamina powoduje wzrost ekspresji HSP70 (Chow i Zhang, 1998). W komórkach Jurkat T (linia ludzkich limfocytów T) Gln stymuluje ekspresję antyapoptotycznego białka Bcl-2 i CD45RO, a obniża ekspresję CD95 i jego ligandu, CD95L, co sugeruje ochronę komórek przed apoptozą (Chang i wsp., 2002). W szczurzych neutrofilach Gln prowadzi do wzrostu ekspresji genu antyapoptotycznego *bcl-2* (Pithon-Curi i wsp., 2003) oraz genów kodujących podjednostki oksydazy NADPH (Pithon-Curi i wsp., 2002) chroniąc w ten sposób komórki przed apoptozą. W szczurzych hepatocytach Gln wzmacnia ekspresję  $\beta$ -aktyny (Husson i wsp., 1996) oraz ekspresję i aktywność syntazy argininobursztynianowej związanej z cyklem mocznikowym (Quillard i wsp., 1996). Wzrost ekspresji genów kodujących te białka ma najprawdopodobniej związek z pęcznieniem komórek indukowanym przez Gln (Quillard i wsp., 1996). W kardiomiocytach Gln powoduje wzrost ekspresji ciężkiego łańcucha  $\alpha$ -miozyny i  $\alpha$ -aktyny, a także niektórych enzymów metabolicznych (Xia i wsp., 2003). W tej samej pracy wykazano wpływ Gln na aktywację kinazy A i mTOR i - w konsekwencji - na wzrost ekspresji syntazy adenylbursztynianowej kluczowej dla procesu proliferacji. W enterocytach Gln aktywuje kinazy ERK i JNK, w następstwie czego wzrasta ekspresja m.in. c-Jun prowadząc do wzmoczonej proliferacji komórek (Rhoads i wsp., 1997).

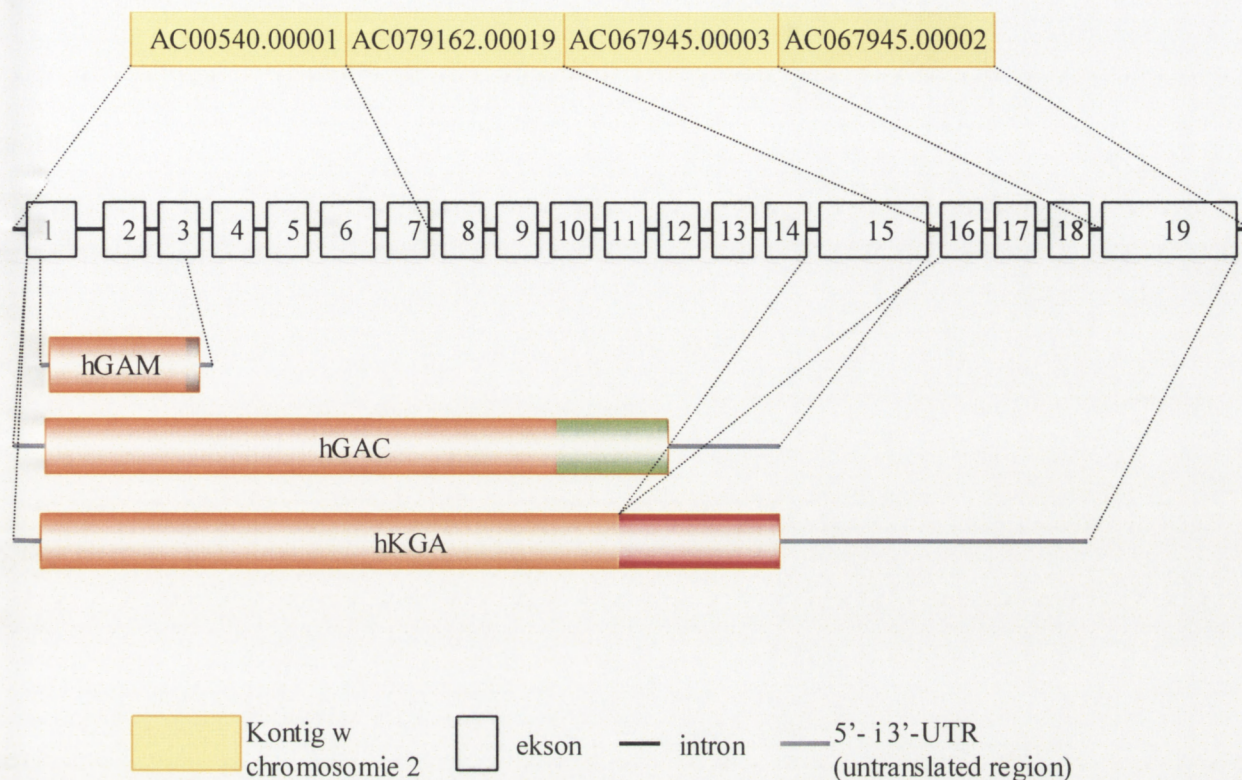
### **II.3. Glutaminaza**

Fakty i hipotezy dotyczące roli glutaminy zarówno w OUN, jak i w biologii nowotworów, spowodowały znaczny wzrost zainteresowania glutaminazą (GA, EC 3.5.1.2) - enzymem katalizującym reakcję hydrolizy glutaminy do glutaminianu i jonów amonowych (Krebs, 1935). W komórkach ssaków zidentyfikowano dwa geny kodujące glutaminazę: gen *KGA* i gen *LGA*. Izoformy powstające z tych genów różnią się między sobą strukturą, właściwościami kinetycznymi oraz tkankami, w których ulegają ekspresji (Curthoys i Watford, 1995).

#### **II.3.1. Glutaminaza typu nerkowego**

Ludzki gen *hKGA* kodujący glutaminazę typu nerkowego (kidney - type glutaminase, KGA) zlokalizowany jest na chromosomie 2 (Aledo i wsp., 2000). Gen ten obejmuje 82 kb (sekwencja podzielona jest na cztery kontigi: GenBank accession number: AC00540.00001,

AC079162.00019, AC067945.00003, AC067945.00002) i złożony jest z 19 eksonów (Porter i wsp., 2002) (Ryc. II.2.).



**Ryc. II.2. Struktura genu *hKGA* i powstające z niego transkrypty.** Na podstawie Elgadi i wsp., 1999; Porter i wsp., 2002, zmodyfikowane.

Transkrypt *hKGA* powstaje z eksonów 1-14 i 16-19 (Ryc. II.2.) i koduje białko prekursorowe o masie cząsteczkowej 73.5 kDa, które ulega proteolizie do białka o masie cząsteczkowej 66 kDa (Holcomb i wsp., 2000). Analiza Northern blot wykazała silną ekspresję *hKGA* w nerce i mózgu oraz słabszą ekspresję w sercu, płucach, trzustce, łożysku (Elgadi i wsp., 1999; Aledo i wsp., 2000) i w mięśniach szkieletowych (Elgadi i wsp., 1999). Bardziej skomplikowanej obróbce enzymatycznej ulega szczurza KGA: z białka prekursorowego o masie 72 kDa powstaje produkt przejściowy o masie 71 kDa (Perera i wsp., 1990), a następnie dwa peptydy o masach 68 i 65 kDa (Shapiro i wsp., 1987; Perera i wsp., 1990). Dojrzałe białko rKGA jest tetramerem zbudowanym z 3 podjednostek o masie 65 kDa i jednej podjednostki o masie 68 kDa (Shapiro i wsp., 1987; Perera i wsp., 1990; Shapiro i wsp., 1991; Perera i wsp., 1991). Rola produktu przejściowego jest nieznana, ale wydaje się, że ma ona związek z lokalizacją białka w komórce. Zarówno hKGA, jak i rKGA zawierają 16 aminokwasową sekwencję sygnałową odpowiedzialną za mitochondrialną lokalizację białka (Shapiro i wsp., 1991; Elgadi i wsp., 1999; Holcomb i wsp., 1999). Pierwsza reakcja proteolityczna odsłaniałaby wówczas sekwencję sygnałową. Możliwe również, że tak złożona

proteoliza gwarantuje powstanie aktywnego tetrameru – opóźnienie procesu fałdowania białka zapewnia czas potrzebny do interakcji między poszczególnymi podjednostkami (Perera i wsp., 1990; Perera i wsp., 1991).

Poza opisanymi wyżej peptydami powstającymi z białka prekursorowego rKGA zaobserwowano dodatkowo białka o masach 61 i 58 kDa (Shapiro i wsp., 1987; Perera i wsp., 1991). Jedną z hipotez dotyczących genezy kilku peptydów o różnych masach zakłada, że powstają one w drodze kompetycyjnych reakcji proteolitycznych. Inną możliwością są kowalencyjne modyfikacje peptydów – wówczas z białek o masach 65 i 58 kDa powstawałyby produkty końcowe o masach 68 i 61 kDa (Perera i wsp., 1990; Perera i wsp., 1991).

KGA charakteryzuje się niską  $K_m$  dla glutaminy, wysoką  $K_m$  dla jonów fosforanowych, do aktywności enzymatycznej nie wymaga obecności jonów amonowych, a jej aktywność jest blokowana przez glutaminian (Curthoys i Watford, 1995).

Sekwencje nukleotydowe cDNA *hKGA* i *rKGA* wykazują 89% podobieństwo, a sekwencje aminokwasowe – 98% podobieństwo (Elgadi i wsp., 1999). Jedynie pierwsze 72 aminokwasy wykazują niższe podobieństwo, na poziomie 74% - stąd prawdopodobnie wynikają różnice w procesowaniu rKGA i hKGA (Holcomb i wsp., 1999).

Z genu *hKGA* tworzą się w drodze alternatywnego splicingu dwa inne transkrypty: hGAC i hGAM (Elgadi i wsp., 1999) (Ryc. II.2). Izoforma hGAC powstaje z eksonów 1-15, a zatem różni się od izoformy hKGA sekwencją kodowaną przez ekson 15 (Porter i wsp., 2002). Obecność transkryptu hGAC stwierdzono w sercu, trzustce, łożysku, nerkach i płucach (Elgadi i wsp., 1999). Transkrypt hGAM koduje peptyd złożony ze 169 aminokwasów, przy czym 161 aminokwasów jest takich samych, jak w potencjalnej sekwencji aminokwasowej hGAC, a jedynie 8 ostatnich aminokwasów koduje unikalną sekwencję C-końca (Elgadi i wsp., 1999). Ekspresję transkryptu hGAM stwierdzono w sercu i mięśniach szkieletowych (Elgadi i wsp., 1999). Ze względu na brak specyficznych przeciwciał, izoformy te zostały scharakteryzowane tylko na poziomie transkryptów. Wysunięto jednak hipotezę, że transkrypt hGAC koduje białko aktywne enzymatycznie: w komórkach linii raka piersi TSE hGAC jest dominującą izoformą przy jednoczesnym braku hKGA, a zatem hGAC musi odpowiadać za bardzo wysoki poziom aktywności glutaminazowej stwierdzony w tych komórkach (Elgadi i wsp., 1999). Aktywność hGAM jest jeszcze bardziej kontrowersyjna: serce i mięśnie



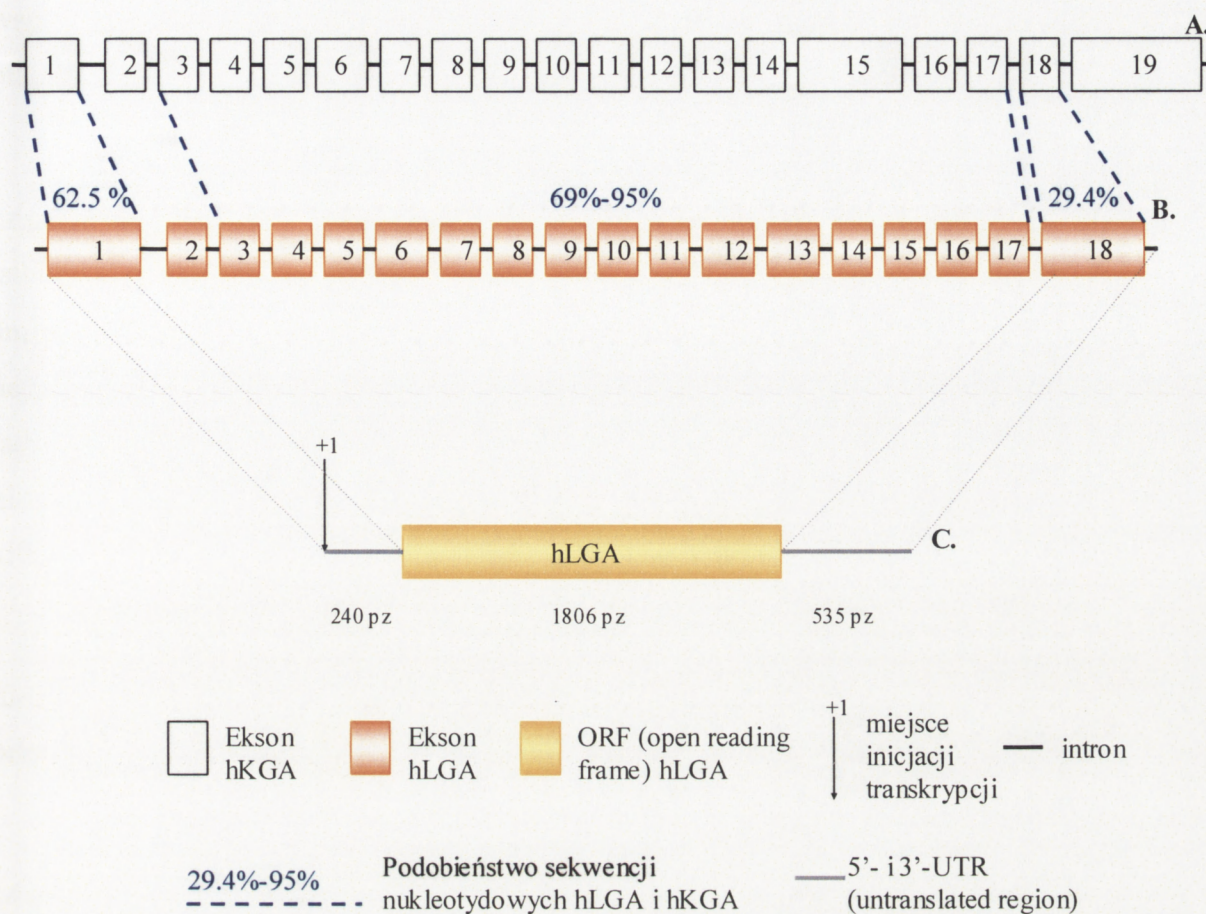
szkieletowe charakteryzują się niskim poziomem aktywności glutaminazowej, być może zatem formowanie transkryptu hGAM ma na celu zredukowanie poziomu aktywnego enzymu w tych tkankach (Elgadi i wsp., 1999).

Przypuszcza się, że – podobnie jak hKGA – hGAC i hGAM powinny lokalizować się w mitochondriach, zawierają bowiem mitochondrialną sekwencję sygnałową (Elgadi i wsp., 1999).

### II.3.2. Glutaminaza typu wątrobowego

Ludzki gen *hLGA* kodujący wątrobową izoformę glutaminazy (liver-type glutaminase, LGA) zlokalizowany jest na chromosomie 12 (Aledo i wsp., 2000), locus: 12q13, a jego struktura została opisana przez Perez-Gomez i wsp. (2003). Gen ten (GenBank accession number: AF348119) obejmuje 18.1 kb i złożony jest z 18 eksonów (Ryc. II.3.). Analiza Northern blot wykazała ekspresję *hLGA* w wątrobie, mózgu, trzustce (Gomez-Fabre i wsp., 2000). Dotychczas zidentyfikowano jeden transkrypt powstający z genu *hLGA* (Gomez-Fabre i wsp., 2000), jednak istnieją przesłanki sugerujące alternatywny splicing tego genu: analiza Western blot z przeciwciałem anti-LGA wykazała istnienie izoenzymów o różnych masach cząsteczkowych w mysiej wątrobie i mózgu (Campos i wsp., 2003). Porównanie sekwencji ludzkiej *LGA* ze szczurzą *LGA* sklonowaną przez Chung-Bok i wsp. (1997) wykazuje 89% podobieństwa na poziomie sekwencji nukleotydowych i 96% podobieństwa na poziomie sekwencji aminokwasowych; także różnice w układzie eksonów i intronów tych genów są minimalne (Perez-Gomez i wsp., 2003). Jednakże szczurza *LGA* nie zawiera 61 aminokwasów kodowanych przez ekson 1 i pierwszych 6 aminokwasów kodowanych przez ekson 2, co również może sugerować istnienie alternatywnych transkryptów tego genu.

Analiza struktury genów *hLGA* i *hKGA* wykazała, że eksony od 3- do 17-tego tych genów mają taką samą długość, a ich sekwencje nukleotydowe i aminokwasowe wykazują znaczne podobieństwo (69%-95%). Znacznie większe różnice w sekwencjach wykazują eksony 1-sze (62.5% podobieństwa) i 18-ste (tylko 29.4% podobieństwa) tych genów. Sekwencje kodowane przez pierwsze eksony zawierają informację o komórkowej lokalizacji kodowanego białka, natomiast w ostatnich eksonach zakodowane są sekwencje domen odpowiedzialnych za oddziaływanie z innymi białkami. Zatem konsekwencją znacznych różnic w sekwencjach między tymi eksonami może być odmienna lokalizacja komórkowa i funkcja białek (Perez – Gomez, 2003).



**Ryc. II.3. Struktura genu *hLGA*.** Przedstawiono schematyczne porównanie struktury genów *hKGA* (A.) i *hLGA* (B.) zaznaczając podobieństwo sekwencji nukleotydowych. Prezentowane długości poszczególnych eksonów i intronów nie odzwierciedlają faktycznych rozmiarów. Przedstawiono także powstający z genu *hLGA* transkrypt (C.). Na podstawie Perez-Gormez i wsp., 2003, zmodyfikowane.

LGA wymaga do aktywności enzymatycznej jonów amonowych, charakteryzuje się niską  $K_m$  dla jonów fosforanowych, wysoką  $K_m$  dla glutaminy i – w przeciwieństwie do KGA – jej aktywność nie jest hamowana glutaminianem (Kovacevic i McGivan, 1983; Curthoys i Watford, 1995).

### II.3.3. LGA jako czynnik transkrypcyjny

Przez długi czas glutaminaza była postrzegana jako enzym ściśle związany z mitochondriami (Klingman i Handler, 1958; Kovacevic, 1974; Aledo i wsp., 1994). Zatem stwierdzenie obecności LGA w jądrach komórkowych w mózgu małpy i szczura (Olalla i

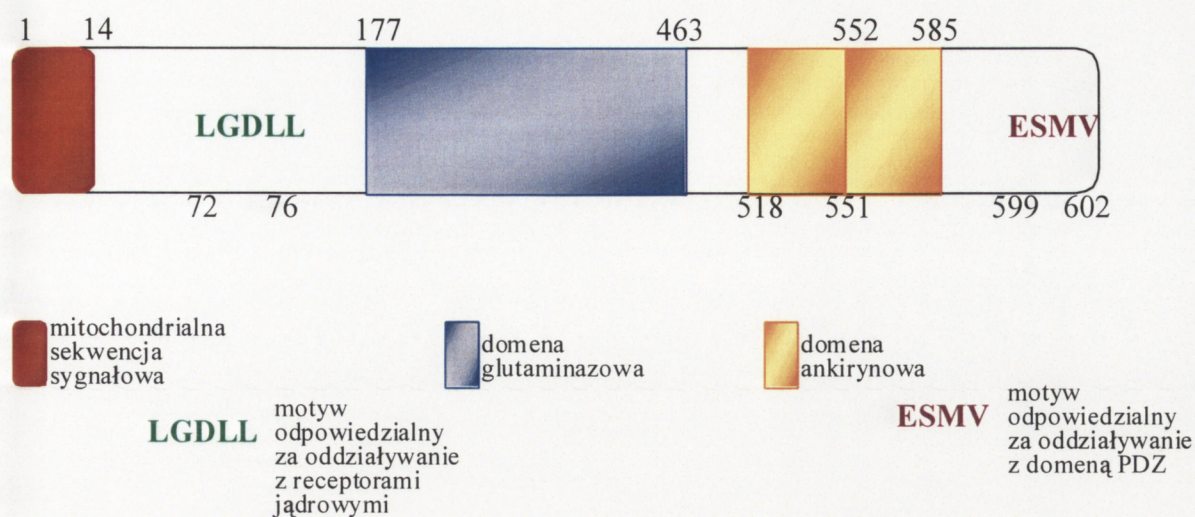
wsp., 2002) było odkryciem zaskakującym i dało impuls do spekulacji na temat roli tego białka jako czynnika transkrypcyjnego.

Białko kodowane przez gen *hLGA* składa się z 602 aminokwasów i ma masę cząsteczkową 66.3 kDa (Gomez-Fabre i wsp., 2000). Analiza sekwencji tego białka sugeruje istnienie w jego N-końcu mitochondrialnej sekwencji sygnałowej: pierwsze 14 reszt aminokwasowych ma charakter zasadowy lub neutralny i może tworzyć amfipatyczną  $\alpha$ -helisę (Gomez-Fabre i wsp., 2000). Jednocześnie nie zidentyfikowano w obrębie białka LGA jądrowej sekwencji sygnałowej, stąd mechanizm potencjalnej translokacji LGA do jądra jest nieznany (Olalla i wsp., 2002). Możliwe, że istotną rolę w tym procesie odgrywa jeden lub kilka motywów występujących w obrębie LGA (Ryc.II.4.):

► sekwencja LGDLL zlokalizowana w pierwszym eksonie LGA. Wykazano, że motyw LXXLL umożliwia interakcje białka z receptorami jądrowymi (Heery i wsp., 1997) oraz może brać udział w translokacji białek do jądra komórkowego (Meertens i wsp., 1998).

► sekwencja ESMV zlokalizowana w C-końcu LGA odpowiedzialna za interakcje LGA z białkami zawierającymi domenę PDZ (**p**ostsynaptic density protein-95/**d**iscs large/zona occludens-1): GIP (Glutaminase Interacting Protein) i SNT ( $\alpha$ -1-syntrophin) (Olalla i wsp., 2001). Istnieją liczne doniesienia o roli domen PDZ w oddziaływaniach pomiędzy białkami, fałdowaniu białek (Jemth i Gianni, 2007), transdukcji sygnału (Zimmermann i wsp., 2006) oraz w lokalizacji białek w komórce (Yang i wsp., 1998; Yang i wsp., 1999; Harris i Lim, 2001). Wykazano między innymi, że niektóre białka zawierające domenę PDZ zlokalizowane są w jądrze komórkowym (Hsueh i wsp., 2000; Hogan i wsp., 2001).

► dwie reszty ankirynowe zlokalizowane w C-końcu. Białka zawierające reszty ankirynowe odgrywają istotną rolę między innymi w przekazywaniu sygnałów, integralności cytoszkieletu, regulacji procesu transkrypcji i cyklu komórkowego, a także w transporcie komórkowym (Mosavi i wsp., 2004), w tym w transporcie jądrowym (Zhang i wsp., 2007).



**Ryc.II.4. Struktura białka hLGA.** Na podstawie Marquez i wsp., 2006, zmodyfikowane.

#### II.3.4. Glutaminazy w nowotworach

Istotna rola, jaką glutamina pełni w komórkach nowotworowych spowodowała wzrost zainteresowania ekspresją i aktywnością glutaminaz w tych komórkach. Należy zaznaczyć, że starsze dane dotyczą badań nad glutaminazą bez rozróżniania jej izoform.

Wykazano, że komórki hepatoma charakteryzują się zwiększoną aktywnością glutaminazy w porównaniu do komórek pochodzących ze zdrowej wątroby (Matsuno i Hirai, 1989; Matsuno i Goto, 1992). W komórkach linii hepatoblastoma HepG2 zidentyfikowano zbliżone ilości białka KGA, jak i LGA, przy czym aktywność enzymatyczną wykazuje głównie izoforma KGA (Perez-Gomez i wsp., 2005). W komórkach EATC zarówno aktywność, jak i poziom mRNA GA jest najwyższy w fazie wzrostu wykładniczego komórek (Aledo i wsp., 1994). Komórki linii TSE wyprowadzonej z raka piersi wykazują podwyższony poziom aktywności i ekspresji mRNA GA (Collins i wsp., 1998), przy czym dominującą izoformą w tych komórkach jest GAC (Elgadi i wsp., 1999). Komórki innych linii raka piersi, ZR-75-1 i MCF-7, ekspresyjną zarówno KGA, jak i LGA i – podobnie jak w komórkach linii HepG2 – aktywność enzymatyczną przypisuje się przede wszystkim izoformie KGA (Perez-Gomez i wsp., 2005).

Komórki różnych linii wyprowadzonych z raka okrężnicy ekspresyjnie wykazują wszystkie izoformy GA, ale najbardziej aktywną izoformą jest KGA (Turner i McGivan, 2003). Jednocześnie aktywność glutaminazy jest przeszło dwukrotnie wyższa w komórkach linii adenoma, niż w komórkach linii carcinoma, co według autorów pracy sugeruje, że w intensywnie dzielących się komórkach o wyższym stopniu złośliwości aktywność glutaminazy jest obniżona, a głównym źródłem energii w tych komórkach jest glukoza (Turner i McGivan, 2003).

Białka KGA i LGA ulegają ekspresji na zbliżonym poziomie w komórkach linii chronicznej białaczki szpikowej, natomiast w komórkach szpiku pochodzących od pacjentów cierpiących na ostrą białaczkę limfoblastyczną stwierdzono 10-krotnie wyższy poziom transkryptu genu *LGA* w stosunku do *KGA* (Perez-Gomez i wsp., 2005). W dojrzałych nieproliferujących limfocytach pochodzących od pacjentów z aplazją szpiku ekspresji ulega tylko gen *LGA* (Perez-Gomez i wsp., 2005). Wyniki badań nad ekspresją i aktywnością glutaminaz w komórkach różnych typów nowotworów *in situ* i linii nowotworowych sugerują, że wysoki poziom ekspresji genu *KGA* jest charakterystyczny dla komórek silnie proliferujących, natomiast *LGA* ulega silnej ekspresji w zróżnicowanych komórkach nieulegających podziałom (Perez-Gomez i wsp., 2005).

Od kilku lat badania nad rolą glutaminaz w procesie nowotworzenia obejmują także blokowanie ekspresji GA w różnych układach modelowych, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Ekspresja antysensownego cDNA szczurzej KGA w mysich komórkach linii EATC obniża potencjał proliferacyjny tych komórek oraz zmienia ich morfologię (Lobo i wsp., 2000). Komórki te charakteryzują się również obniżonym poziomem GSH, nasiloną apoptozą oraz większą wrażliwością na toksyczne działanie metotreksatu i nadtlenu wodoru w stosunku do dzikich komórek linii EATC (Lora i wsp., 2004). Zablockowanie ekspresji KGA w komórkach EATC powoduje także spadek ekspresji niektórych genów związanych z procesem proliferacji (Martin-Rufian i wsp., 2005) oraz wzrost ekspresji czynników transkrypcyjnych Sp1 i Sp3, poziomu ufosforylowania Sp1 i - w konsekwencji – aktywności transkrypcyjnej tego białka (Segura i wsp., 2005).

Komórki EATC z zablockowaną ekspresją *KGA* inokulowane myszom nie powodują procesu nowotworzenia, w przeciwieństwie do komórek dzikiej linii EATC (Lobo i wsp., 2000). Wynika to najprawdopodobniej z faktu, że komórki EATC transfekowane antysensownym cDNA blokującym ekspresję *KGA* wykazują znacznie obniżony poziom białek

zaangażowanych w mechanizmy obronne, a zatem są bardziej wrażliwe na immunologiczną odpowiedź organizmu gospodarza w stosunku do komórek EATC (Segura i wsp., 2001).

### III. Cel pracy

Prezentowana praca koncentruje się na roli glutaminazy typu wątrobowego w glejopochodnych komórkach nowotworowych. Dane literaturowe sugerują, że białko to może pełnić funkcję enzymu metabolizującego glutaminę - podstawowe źródło energii dla komórek nowotworowych – ale także może być czynnikiem modulującym proces transkrypcji genów. Jednocześnie istnieją dowody na rozregulowaną ekspresję i/lub aktywność poszczególnych izoform glutaminazy w różnych rodzajach komórek nowotworowych – pochodzących zarówno z guzów *in situ*, jak i z hodowli komórkowych.

Postanowiono zatem odpowiedzieć na następujące pytania:

1). Czy komórki guzów OUN o różnym pochodzeniu i stopniu złośliwości wykazują zaburzenia w ekspresji poszczególnych izoform glutaminazy?

W tym celu zbadano ekspresję genów *LGA*, *KGA* i *GAC* w glejakach o najwyższym stopniu złośliwości (WHO III/IV), a następnie w *pilocytic astrocytoma* (WHO I), *ependymoma* (WHO II/III) oraz w mieszanych guzach neuronalno-glejowych *garglioglioma* (WHO I/III). Analizę uzupełniono badając ekspresję w/w genów w tkankach bez utkania nowotworowego oraz w szczyrzych astrocytach i neuronach pochodzących z hodowli pierwotnych.

2). Czy LGA zmienia własności fenotypowe komórek linii glejaka ludzkiego?

W tym celu przeprowadzono stabilną transfekcję komórek linii glejaka ludzkiego T98G, w których nie stwierdzono obecności transkryptu genu *LGA*, sekwencją kodującą ludzką LGA, a następnie na komórkach przeprowadzono szereg testów badających cechy związane z procesem nowotworzenia.

3). Czy LGA moduluje proces transkrypcji genów?

W tym celu przeprowadzono kompleksową analizę ekspresji genów w dzikich komórkach T98G i komórkach poddanych transfekcji sekwencją kodującą LGA. Do analizy zastosowano metodę mikromacierzy DNA, a do weryfikacji otrzymanych wyników – metodę real-time PCR.

## IV. Materiały i metody

### IV.1. Materiał biopsyjny

W badaniach wykorzystano materiał biopsyjny pochodzący z Kliniki Neurochirurgii Akademii Medycznej w Warszawie i Zakładu Patologii Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie – dane dotyczące materiału przedstawia Tabela IV.1.

**Tab.IV.1. Materiał biopsyjny wykorzystany w badaniach.**

Materiał	Stopień złośliwości wg WHO	Liczba przypadków
glioblastoma	IV	7
anaplastic astrocytoma	III	2
pilocytic astrocytoma	I	9
ependymoma / anaplastic ependymoma	II / III	6
ganglioglioma / anaplastic ganglioglioma	I / III	7
subependymal giant cell astrocytoma (SEGA)	I	2
oligodendroglioma	II	1
przerzuty nowotworów narządów obwodowych do OUN	Nie dotyczy	8
kora mózgowa pochodząca od pacjentów z padaczką	Nie dotyczy	3

Materiał był przechowywany w temp.  $-70^{\circ}\text{C}$  w buforze RNALater (Sigma) do czasu izolacji kwasów nukleinowych. W momencie rozpoczęcia badań molekularnych część materiału utrwalano w 10% formaldehydzie i oceniano histopatologicznie. Weryfikacja tkanki pobranej do badań molekularnych była prowadzona przez lekarza ze specjalizacją II<sup>o</sup> z neuropatologii, a rozpoznania stawiane były wg obowiązującej klasyfikacji WHO guzów OUN. Materiał podlegał ocenie histopatologicznej, w tym również immunohistochemicznej, w celu weryfikacji rozpoznania oraz wykluczenia fragmentów zawierających zmiany martwicze (do 80% masy guza w przypadkach złośliwych rozrostów nowotworowych glejopochodnych). Kilka tkanek wstępnie zdiagnozowanych jako zmienione nowotworowo zostało wykluczonych z dalszych badań molekularnych po weryfikacji histopatologicznej ze względu na obecne w nich zmiany



martwicze, dlatego liczba przypadków przedstawiona w Tabeli IV.1. nie pokrywa się z liczbą przypadków podaną w **Wynikach** (Rozdz. V.1.).

Ocena histopatologiczna materiału nowotworowego służyła również do wyselekcjonowania pochodzących z obrzeża pola operacyjnego fragmentów tkanki niezawierającej utkania nowotworowego, które wykorzystywane były jako tkanka kontrolna.

#### **IV.2. Linia komórkowa glejaka ludzkiego T98G**

Linia komórkowa T98G wyprowadzona z komórek ludzkiego *glioblastoma* pochodziła z American Type Culture Collection (ATCC). Komórki hodowano – w zależności od eksperymentu – na szalkach o średnicy 3- lub 10-cm oraz w 6- lub 24-studzienkowych płytkach. Podstawową pożywką wykorzystywaną w hodowli była pożywka Minimal Essential Medium Eagle (MEM) (Sigma), uzupełniona 10% płodową surowicą bydlęcą (*ang. Fetal Bovine Serum, FBS*) (Gibco/BRL), roztworem aminokwasów (Sigma) w stężeniu 1% oraz antybiotykami: penicyliną (50 U/ml) i streptomycyną (50 µg/ml) (Gibco/BRL). Ewentualne modyfikacje składu pożywki zawarte są w opisie poszczególnych eksperymentów. Hodowlę prowadzono w 37°C, w atmosferze zawierającej 5% CO<sub>2</sub> i 95% powietrza.

W eksperymentach wykorzystywano komórki z pasaży od 4 do 60. Czas hodowli wynosił 72h. Pasażowane hodowle były przemywane buforem fosforanowym PBS (Gibco/BRL), trypsynizowane 0.25% roztworem trypsyny (Sigma), a następnie rozcieńczane świeżą pożywką i rozdzielane do nowych szalek hodowlanych. Jeżeli w eksperymencie istotna była wyjściowa liczba komórek, po trypsynizacji komórki liczono za pomocą hematocytometru, jednocześnie oceniając ich żywotność błękitem trypanu.

#### **IV.3. Hodowle pierwotne szczurzych astrocytów**

Hodowle pierwotne szczurzych astrocytów prowadzone były wg protokołu opisanego przez Hertz i wsp. (1989) z niewielkimi modyfikacjami. Fragmenty kory mózgowej jednodniowych szczurów rasy Wistar przecierano przez sterylną siatkę nylonową o 80 µm porach do pożywki Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma) zawierającej 20% FBS (Gibco/BRL) i antybiotyki: penicylinę (50 U/ml) i

streptomycynę (50 µg/ml) (Gibco/BRL). Po tygodniu hodowli zredukowano stężenie FBS w pożywce do 15%, a po kolejnym tygodniu – do 10%. Doświadczenia wykonywano na komórkach w trzecim tygodniu hodowli. Od drugiego tygodnia hodowli dodawano do pożywki dibutyrylo-cAMP (Sigma) w celu uniknięcia różnicowania się komórek.

#### ***IV.4. Hodowle pierwotne szczurzych neuronów***

Szczurze neurony korowe były preparowane według protokołu opisanego przez Schousboe i wsp. (1989) i hodowane przez Panią mgr M. Słomkę z Zakładu Neurochemii CMDiK.

#### ***IV.5. Wektory pcDNA i pLGA***

Do transfekcji komórek linii T98G użyto wektora pLGA skonstruowanego przez Panią dr C. Lobo w Zakładzie Biologii Molekularnej i Biochemii Uniwersytetu w Maladze, Hiszpania. Wektor pLGA zawierał pełną sekwencję cDNA ludzkiej LGA (GenBank: NM\_013267) wklonowaną do wektora pcDNA3 (Invitrogen) trawionego enzymami EcoRI i XhoI.

#### ***IV.6. Izolacja RNA***

Materiał operacyjny homogenizowano w szklanym homogenizatorze (Whatman), a komórki hodowane na płytkach lizowano po odciążeniu pożywki i przepłukaniu materiału buforem PBS. Homogenizację materiału/lizę komórek prowadzono w odczynniku Tri-Reagent (Sigma) w temperaturze pokojowej. Następnie dodawano 200 µl chloroformu (Sigma), wytrząsano przez 30 sekund i wirowano 15 minut przy 12000 x g w 4°C. Fazę wodną przenoszono do 600 µl schłodzonego izopropanolu (Sigma) i inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Mieszaninę wirowano 10 minut przy 12000 x g w 4°C. Supernatant usuwano, osad przepłukiwano 1 ml schłodzonego 70% etanolu, a następnie wirowano 5 minut przy 10000 x g w 4°C. Osad suszono 15 minut w temperaturze pokojowej, po czym zawieszano go w H<sub>2</sub>O z 0.1% inhibitorem RNaz, dietylopirowęglańcem (DEPC) (Sigma) przez noc w 4°C.

Stężenie i czystość preparatów RNA oznaczano spektrofotometrycznie mierząc gęstość optyczną przy 260 i 280 nm w spektrofotometrze Ultrospec 2000 (Pharmacia

Biotech) wykorzystując zasadę, że  $OD_{260} = 1$  odpowiada ok. 40  $\mu\text{g/ml}$  RNA, a stosunek  $OD_{260}/OD_{280} = 2$  oznacza czysty preparat RNA. Do reakcji RT-PCR stosowano preparaty RNA, których  $OD_{260}/OD_{280}$  był większy niż 1.7.

#### IV.7. Reakcja odwrotnej transkrypcji

2  $\mu\text{g}$  RNA trawiono przez 15 minut w temperaturze pokojowej DNaząI (Invitrogen), a następnie inaktywowano enzym inkubując mieszaninę w obecności 2.5 mM EDTA (Invitrogen) w  $65^{\circ}\text{C}$  przez 10 minut. Do reakcji odwrotnej transkrypcji (*ang. reverse-transcription, RT*) stosowano zestaw odczynników High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems).

Mieszaninę reakcyjną, której skład przedstawia Tabela IV.2. inkubowano w termocyklerze Biometra stosując następujące warunki:

- ▶  $25^{\circ}\text{C}$ , 10 min
- ▶  $37^{\circ}\text{C}$ , 120 min
- ▶  $85^{\circ}\text{C}$ , 5 s.

**Tab. IV.2. Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej w reakcjach odwrotnej transkrypcji.**

Składnik	objętość
10 x bufor RT	2 $\mu\text{l}$
25 x dNTP Mix (100mM)	0.8 $\mu\text{l}$
10 x Random Primers	2 $\mu\text{l}$
MultiScribe <sup>TM</sup> Reverse Transcriptase	1 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O DEPC	12.2 $\mu\text{l}$
cDNA	2 $\mu\text{l}$

#### IV.8. Reakcja łańcuchowa polimerazy

Mieszaninę reakcyjną, której skład przedstawia Tabela IV.3., poddawano reakcji łańcuchowej polimerazy (*ang. polymerase chain reaction, PCR*). Mieszaninę inkubowano w termocylerze Biometra stosując następujące warunki:

- ▶ Denaturacja wstępna: 5 min, 94°C
  - ▶ Denaturacja: 1 min, 94°C
  - ▶ Przyłączanie starterów (*ang. annealing*): 1 min, 58°C (*LGA* i *GAPDH*),  
59°C (*KGA* i *GAC*), 62°C (*ACTB*)
  - ▶ Wydłużanie łańcucha (*ang. extending*): 72°C, 1 min
  - ▶ Końcowe wydłużanie: 72°C, 10 min
- } 30 cykli

**Tab. IV.3. Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej w reakcjach PCR.**

Składnik	objętość
cDNA	2 $\mu$ l
dNTP Mix (10 mM) (Sigma)	1 $\mu$ l
10 x Bufor dla polimerazy Taq (Fermentas)	2.5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25 mM) (Fermentas)	2 $\mu$ l
Startery (10 $\mu$ M) (Oligo, IBB PAN)	2 x 1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	14.5 $\mu$ l
Polimeraza Taq, 0.5 U/ $\mu$ l (Fermentas)	1 $\mu$ l

Do reakcji PCR stosowano oligonukleotydy zsyntetyzowane w Pracowni Sekwencjonowania i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki (IBB) PAN w Warszawie. Tabela IV.4. przedstawia sekwencje poszczególnych oligonukleotydów i geny do których są komplementarne oraz wielkości otrzymywanych produktów w parach zasad (*pz*) (*ang. base pair, bp*).

Tab. IV.4. Startery stosowane w reakcjach PCR.

Nazwa genu	Numer sekwencji w GenBanku	Sekwencje starterów (5'→3')	Pozycja	Wielkość produktu (pz)
<i>hLGA</i>	NM_013267	F tccagctgtgttctgtggag R ggaggatggctcctgataca	1322-1341 1546-1527	224
<i>hKGA</i>	NM_014905	F ggtctcctcctctggataagatgg R cccgttgtcagaatctccttgagg	1732-1755 2195-2172	464
<i>hGAC</i>	AF158555	F ggtctcctcctctggataagatgg R gatgtcctcatttgactcaggtgac	1745-1769 1993-1969	248
<i>hACTB</i>	NM_001101	F tccttctgggcatggagt R aaagccatgccaatctcatc	866-884 1284-1265	418
<i>hGAPDH</i>	XR_018317.1	F tgaaggtcggagtcacggatttg R catgtaggcatgaggtccaccac	11-35 994-971	983
<i>rLGA</i>	NM_138904	F gaggggcatcctcaggct R gcatcttgctcatgcagtc	67-84 276-257	209
<i>rKGA</i>	NM_012569	F ggtctcctcctctggataagatgg R cccgttgtcagaatctccttgagg	1575-1598 2032-2015	457
<i>rGAC</i>	AY083459	F ggtctcctcctctggataagatgg R gatgtcctcatttgactcaggtgac	623-646 868-846	245
<i>rACTB</i>	NM_031144	F tccttctgggtatggaat R aaagccatgccaatctcatc	874-893 1267-1248	393

#### IV.9. Elektroforeza w żelu agarozowym

Produkty PCR rozdzielano w żelu agarozowym o stężeniu 1% lub 2% w zależności od wielkości produktów. Agarozę (Sigma) rozpuszczano w 0.5 x buforze TBE (50 mM Tris, 0.5 mM EDTA, 50 mM kwas borowy, pH 8.3) i uzupełniano bromkiem etydy (Promega) do końcowego stężenia 0.2 µg/ml. Elektroforezę prowadzono w buforze 0.5 x TBE przy natężeniu prądu 8 V/cm. Przed naniesieniem na żel do próbek dodawano bufor obciążający Loading Dye (Fermentas). Wielkość rozdzielanych fragmentów DNA kalibrowano względem markera wielkości GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas).

Produkty PCR oglądano w świetle UV, a następnie poddawano analizie densytometrycznej w aparacie Nucleovision wykorzystując oprogramowanie GelExpert 4.0 (NucleoTech). Poziom ekspresji badanych genów mierzono względem poziomu ekspresji genów konstytutywnych: dehydrogenazy aldehydu-3-fosfoglicerynowego (*GAPDH*) lub  $\beta$ -aktyny (*ACTB*).

#### **IV.10. Sekwencjonowanie produktów PCR**

W celu potwierdzenia zgodności sekwencji produktów otrzymywanych w reakcjach RT-PCR z sekwencjami dostępnymi w bazie GenBank, produkty sekwencjonowano w Pracowni Sekwencjonowania i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN w Warszawie, a następnie otrzymane sekwencje porównywano do sekwencji dostępnych w bazie GenBank wykorzystując program BLAST.

#### **IV.11. Transfekcja komórek linii T98G**

Transfekcję komórek linii T98G wektorami pcDNA3 i pLGA przeprowadzono w Zakładzie Biologii Molekularnej i Biochemii Uniwersytetu w Maladze w Hiszpanii. Do transfekcji komórek wykorzystywano metodę lipofekcji. Komórki linii T98G wysiewano na 6-dołkowych płytkach w pożywce bez antybiotyków i hodowano dobie, do uzyskania 90% konfluencji. 4  $\mu$ g DNA (pLGA lub pcDNA) rozcieńczano w 250  $\mu$ l pożywki Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen). 10  $\mu$ l Lipofectamine 2000 (Invitrogen) rozcieńczano w 250  $\mu$ l pożywki Opti-MEM I Reduced Serum Medium, a następnie mieszano z rozcieńczonym DNA. Mieszaninę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 20 minut, po czym dodawano ją do komórek. Równolegle prowadzono hodowlę kontrolną, dodając do komórek odczynnik Lipofectamine 2000 bez żadnego z wektorów lub czystą pożywkę Opti-MEM I Reduced Serum Medium. Komórki inkubowano przez 24 h w 37°C, w atmosferze zawierającej 5% CO<sub>2</sub> i 95% powietrza. Po tym czasie komórki pasażowano zawieszając je w świeżej pożywce o standardowym składzie (opisanym w pkt. IV.2.). 24 h po pasażu dodawano do hodowli antybiotyk selekcyjny: genetycynę (G418) (Sigma) – analog neomycyny - do końcowego stężenia 500  $\mu$ g/ml. Selekcję transfektantów prowadzono przez 21 dni, do momentu wymarcia puli komórek kontrolnych. Po tym czasie obniżano stężenie G418 do 100  $\mu$ g/ml. Otrzymano w ten sposób linie komórek T98G stabilnie transfekowanych wektorem pLGA lub pcDNA, w dalszej części pracy

określanych odpowiednio jako TLGA lub TpcDNA. Komórki linii transfektantów TLGA i TpcDNA hodowano w pożywce uzupełnionej G418 w stężeniu 100 µg/ml. Każdy z opisanych poniżej testów przeprowadzano na komórkach wszystkich trzech linii (T98G, TpcDNA i TLGA), monitorując ekspresję LGA w transfektantach metodą RT-PCR.

#### ***IV.12. Test MTT***

Test MTT wykorzystuje zdolność żywych komórek do redukcji rozpuszczalnej w wodzie żółtej soli tetrazolowej (formazanu błękitu tiazolowego – MTT) do nierozpuszczalnego w wodzie niebieskiego formazanu.

Komórki wysiewano na 24-dółkowe płytki i inkubowano przez 48 h w standardowej (opisanej w pkt IV.2.) pożywce. Po tym czasie komórki płukano PBS, dodawano roztwór MTT (Sigma) do końcowego stężenia 0.5 mg/ml i inkubowano komórki przez 15 minut. Następnie usuwano pożywkę zawierającą MTT, dodawano 5% SDS w buforze PBS i inkubowano przez noc. Do 200 µl mieszaniny dodawano 10 µl izopropanolu i odczytywano absorbancję proporcjonalną do liczby żywych komórek przy długości fali 570 nm w spektrofotometrze (BioRad). Eksperyment powtarzano pięciokrotnie.

#### ***IV.13. Test proliferacji***

W celu oznaczenia indeksu proliferacji przeprowadzano reakcję immunocytochemiczną z monoklonalnym przeciwciałem anti-Ki67. Komórki linii T98G, TpcDNA i TLGA wysiewano na szkiełka nakrywkowe umieszczone w szalkach o średnicy 3 cm i hodowano 48 h w standardowej pożywce (opisanej w punkcie IV.2.). Komórki były utrwalane 4% paraformaldehydem (PFA) i inkubowane w 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w celu zablokowania aktywności endogennych peroksydaz. Następnie komórki inkubowano z BSA (Sigma) przez 15 minut oraz z monoklonalnym przeciwciałem anti-Ki67 (Dako Cytomation) przez 30 minut. Komórki płukano buforem PBS i inkubowano z biotynyłowanym drugorzędowym przeciwciałem anti-IgG (Beckman Coulter) przez 30 minut. Następnie przeprowadzano reakcję z peroksydazą skoniugowaną ze streptawidyną (Beckman Coulter) przez 45 minut, a produkt reakcji był barwiony diaminobenzydyną (Dako Cytomation), po czym przeprowadzano barwienie kontrastowe hematoksyliną. Komórki oglądano pod mikroskopem świetlnym Nikon Eclipse E800. Indeks proliferacji stanowił procent

komórek wykazujących ekspresję Ki67 w przeliczeniu na 1000 komórek. Eksperyment powtarzano trzykrotnie.

#### ***IV.14. Test formowania kolonii***

250 komórek każdej linii (T98G, TpcDNA, TLGA) wysiewano na szalki o średnicy 10 cm i hodowano w pożywce w standardowych warunkach przez 15 dni, zmieniając pożywkę co 3-4 dni. Po 15 dniach hodowli pożywkę usuwano, a uformowane kolonie utrwalano 10% PFA, barwiono roztworem odczynnika Giemsy i liczono. Eksperyment powtarzano pięciokrotnie.

#### ***IV.15. Test migracji***

W teście migracji wykorzystywano filtry Transwell Permeable Supports (Corning Life Sciences). W teście stosowano pożywkę MEM uzupełnioną aminokwasami i antybiotykami (opisaną w punkcie IV.2.), ale pozbawioną surowicy. Membrany o porach o średnicy 8  $\mu\text{m}$  były inkubowane przez 1h w 37°C. Po tym czasie pożywkę wymieniano na świeżą, nanoszono na membrany komórki każdej linii w czterech powtórzeniach i inkubowano przez noc w standardowych warunkach w inkubatorze. Następnie nadmiar komórek i pożywki usuwano z filtrów, a komórki, które uległy migracji utrwalano 4% PFA przez 10 minut i barwiono roztworem barwnika Giemsy. Zabarwione komórki liczono pod mikroskopem. Doświadczenie wykonywano pięciokrotnie.

#### ***IV.16. Analiza ekspresji genów metodą mikromacierzy DNA***

Na wszystkich etapach badania ekspresji genów metodą mikromacierzy wykorzystywano odczynnik firmy Affymetrix. 5  $\mu\text{g}$  RNA używano do syntezy cDNA, który następnie stanowił matrycę do syntezy biotynylowanego cRNA. cDNA i cRNA oczyszczono wykorzystując GeneChip Sample Cleanup Module. cRNA hybrydyzowano z płytą kontrolną, oceniano jakość próbek, a następnie przeprowadzano hybrydyzację z mikromacierzą HG-U133 2.0. Płukanie, barwienie i skanowanie płytek prowadzono w skanerze GeneChip 3000 (Affymetrix) wg zaleceń producenta. Do analizy otrzymanych danych stosowano Bioconductor 1.5 *gcrma* package (Affymetrix). Badanie ekspresji genów metodą mikromacierzy od momentu syntezy cDNA do momentu analizy



statystycznej otrzymanych wyników prowadzone było przez Pracowników Zakładu Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej Centrum Onkologii, Oddział w Gliwicach.

#### IV.17. Analiza ekspresji genów metodą PCR w czasie rzeczywistym

W celu weryfikacji wyników uzyskanych w mikromacierzach, przeprowadzono analizę ekspresji 9 genów stosując metodę PCR w czasie rzeczywistym (*ang. real-time PCR*). Do analizy używano TaqMan Gene Expression Assays (Tab. IV.5.) i TaqMan Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems) oraz preparaty RNA wyizolowane z 5 niezależnych pasaży każdej linii, przy czym preparaty te nie pokrywały się z preparatami RNA użytymi w analizie ekspresji genów z zastosowaniem mikromacierzy. Poziom ekspresji badanych genów mierzono stosując metodę  $\Delta\Delta C_T$  (Livak i Schmittgen, 2001), a genem referencyjnym był gen kodujący  $\beta$ -aktynę, *ACTB*.

Tabela IV.5. Startery zastosowane w analizie ekspresji genów metodą real-time PCR.

Symbol genu	Nazwa genu	Nr starterów (Applied Biosystems)	Numer sekwencji w bazie GenBank
<i>VAMP8</i>	vesicle-associated membrane protein 8	Hs00186809_m1	NM_003761.2
<i>S100A16</i>	S100 calcium binding protein A16	Hs00293488_m1	NM_080388.1
<i>CAPN2</i>	calpain 2, (m/II) large subunit	Hs00965092_m1	NM_001748.3
<i>FNDC3B</i>	fibronectin type III domain containing 3B	Hs00224289_m1	NM_022763.2
<i>DYNC1L1</i>	dynein, cytoplasmic 1, light intermediate chain 1	Hs00211676_m1	NM_016141.1
<i>TIMP4</i>	TIMP metalloproteinase inhibitor 4	Hs00162784_m1	NM_003256.2
<i>MGMT</i>	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	Hs00172470_m1	NM_002412.2
<i>ADM</i>	Adrenomedullin	Hs00181605_m1	NM_001124.1
<i>TIMP1</i>	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	Hs99999139_m1	NM_003254.2

#### IV.18. Metody statystyczne

Otrzymane wyniki przedstawiano w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  odchylenie standardowe (*ang. standard deviation, SD*). Liczby przypadków, próbek i powtórzeń podano w legendzie do każdej ryciny. Znamienność statystyczną określano używając programu GraphPad Prism 3.0 i stosując testy:

▶ Manna-Whitney'a w przypadku badania ekspresji glutaminaz, proliferacji, zdolności do tworzenia kolonii, żywotności i migracji komórek.

▶ Jednokierunkowy test ANOVA i test Tukey'a w przypadku badania ekspresji genów w komórkach trzech linii metodą real-time PCR.

## V. Wyniki

### V.1. Ekspresja GA w guzach mózgu

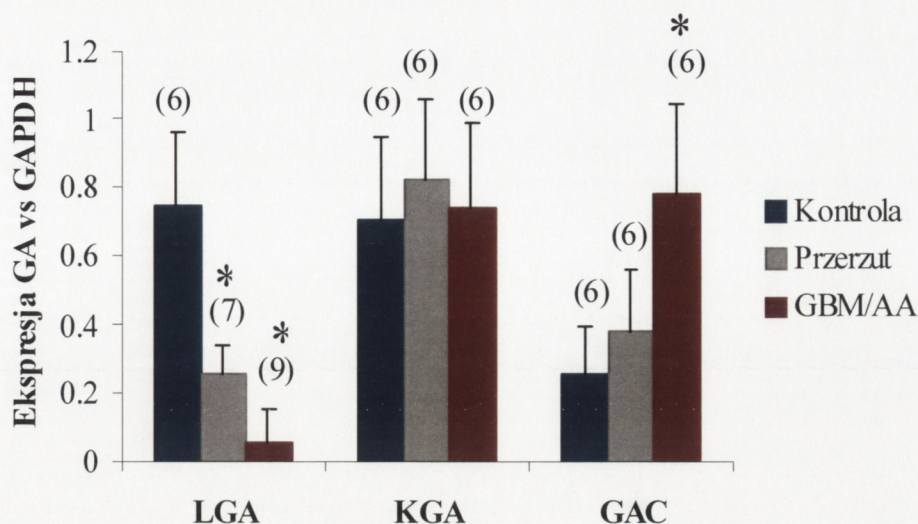
Wykorzystując technikę RT-PCR przeprowadzono analizę ekspresji genów kodujących LGA, KGA i GAC w guzach mózgu o różnym stopniu złośliwości, składzie komórkowym i lokalizacji. Analizę podzielono na dwa etapy – w każdym testowano inną hipotezę i wykorzystano inne grupy guzów jako materiał badawczy, a – w konsekwencji - otrzymane wyniki przedstawiono w odmienny sposób.

#### V.1.1. Ekspresja izoform glutaminazy w glioblastoma i anaplastic astrocytoma oraz w przerzutach nowotworów narządów obwodowych do mózgu

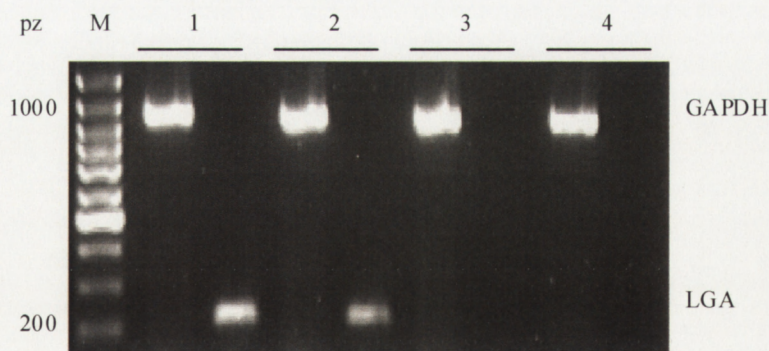
Pierwsza testowana hipoteza zakładała, że glejaki o najwyższym stopniu złośliwości charakteryzują się zaburzoną ekspresją izoform GA. Na tym etapie badań materiałem badawczym były glejaki o najwyższym stopniu złośliwości: *glioblastoma* (WHO IV) i *anaplastic astrocytoma* (WHO III) traktowane jako jedna grupa badana, przerzuty nowotworów narządów obwodowych do mózgu oraz tkanka kontrolna pochodząca z obrzeża pola operacyjnego oceniona histopatologicznie jako nienowotworowa. Poziom ekspresji poszczególnych GA kalibrowano względem poziomu transkryptu genu ludzkiej dehydrogenazy aldehydu-3-fosfoglicerynowego (*GAPDH*).

W 8 z 9 przebadanych przypadków *glioblastoma* i *anaplastic astrocytoma* gen *LGA* nie ulegał ekspresji, natomiast w jednym z przypadków *glioblastoma* znaleziono śladowe ilości transkryptu tego genu (Ryc. V.1). W 2 przypadkach przerzutów nowotworów narządów obwodowych do mózgu gen *LGA* nie ulegał ekspresji, w pozostałych 5 przypadkach poziom ekspresji *LGA* był zróżnicowany (Ryc. V.1). Ekspresję *LGA* stwierdzono we wszystkich przebadanych tkankach kontrolnych (Ryc. V.1). Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów PCR dla genów *LGA* i *GAPDH* przedstawia Ryc. V.2.

Gen *KGA* ulegał ekspresji na podobnym poziomie we wszystkich badanych tkankach, natomiast izoforma GAC wykazała znamiennej statystycznie nadekspresję w *glioblastoma* i *anaplastic astrocytoma* w stosunku do tkanki kontrolnej (Ryc. V.1.).



**Ryc. V.1. Ekspresja poszczególnych izoform GA w glejakiach o najwyższym stopniu złośliwości, przerzutach nowotworów narządów obwodowych do mózgu i tkance kontrolnej.** GBM/AA – *glioblastoma* i *anaplastic astrocytoma* traktowane jako jedna grupa badana. W nawiasach podano liczbę przypadków. Z każdej badanej tkanki wykonywano 3 niezależne izolacje RNA. Wyniki przedstawiono jako średnią  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$  w stosunku do tkanki kontrolnej (Test Manna-Whitney'a).



**Ryc.V.2. Ekspresja LGA w glejakiach o najwyższym stopniu złośliwości, przerzutach nowotworów narządów obwodowych do mózgu i tkance kontrolnej.** Reprezentatywny rozdział elektroforetyczny produktów reakcji RT-PCR dla genów *LGA* i *GAPDH*. M – marker wielkości; 1 - tkanka kontrolna; 2 i 3 – przerzuty nowotworów tkanek obwodowych do mózgu; 4 – *glioblastoma*.

#### V.1.2. Ekspresja izoform glutaminazy w guzach mózgu o różnym stopniu złośliwości i różnym pochodzeniu

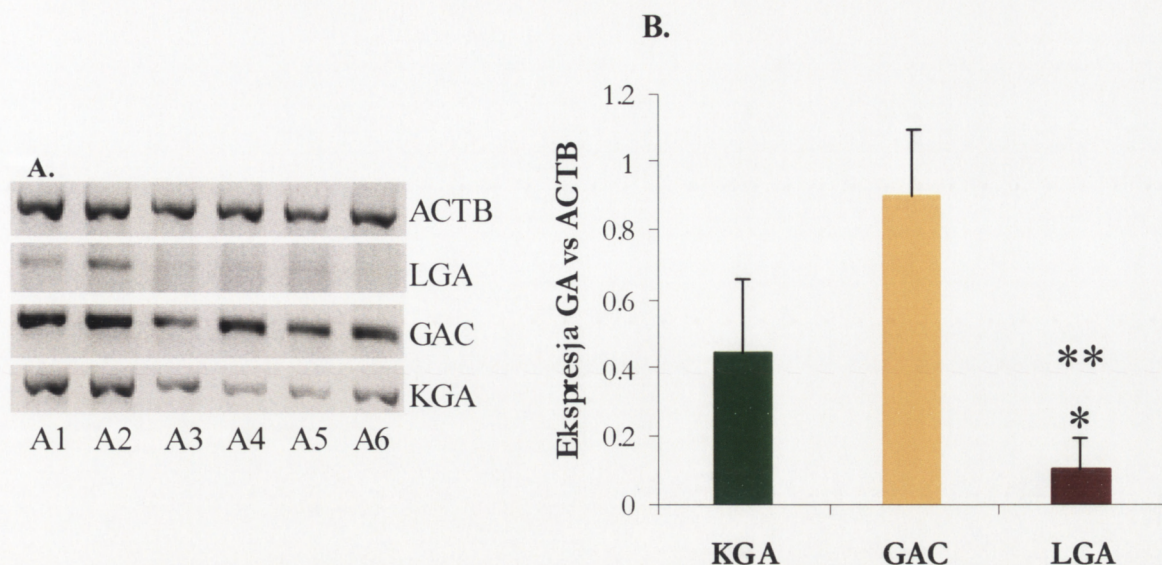
W drugim etapie analizy testowano hipotezę zakładającą, że poziom ekspresji *LGA* nie zależy od stopnia złośliwości nowotworu, natomiast jest związany z typem komórki.

Materiałem badawczym były glejaki o niższych stopniach złośliwości pochodzące z różnych typów komórek glejowych oraz guzy pochodzenia neuronalno-glejowego. Ze względu na brak obrzeża pola operacyjnego w tych przypadkach, kontrolę stanowiła kora mózgowa uzyskana od pacjentów chorych na padaczkę oceniona histopatologicznie jako materiał nienowotworowy. Jednocześnie materiał ten dostarczył informacji o ekspresji glutaminaz w neuronach. Poziom ekspresji poszczególnych glutaminaz kalibrowano względem poziomu transkryptu  $\beta$ -aktyny (*ACTB*).

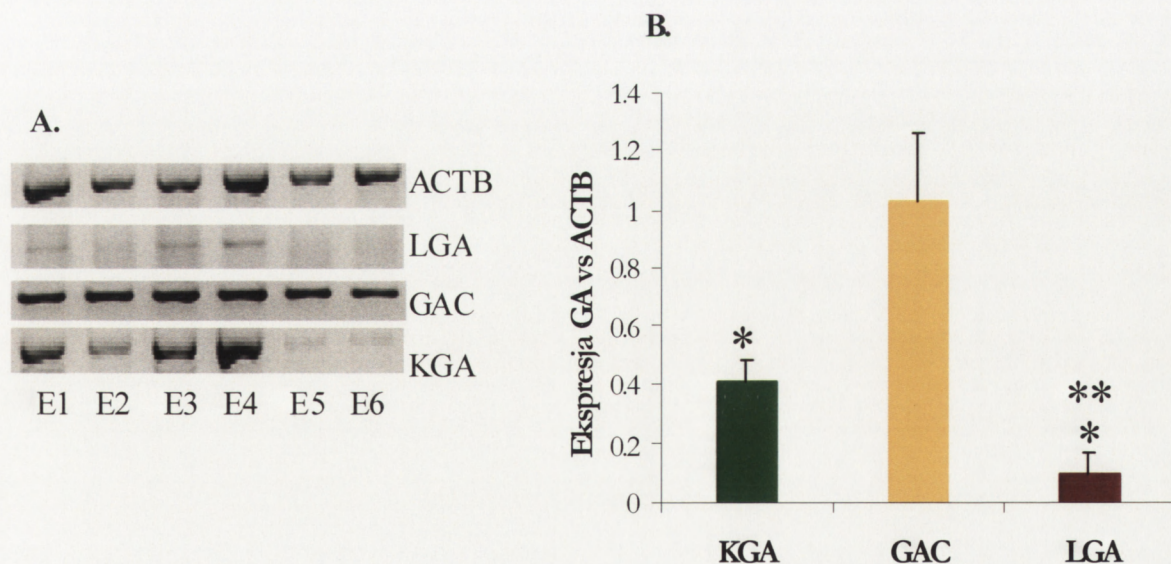
Analiza wykazała niski poziom transkryptu genu *LGA* w 4 z 6 przebadanych przypadkach *pilocytic astrocytoma* oraz brak tego transkryptu w 2 pozostałych przypadkach. Jednocześnie we wszystkich 6 *pilocytic astrocytoma* zaobserwowano nadekspresję izoformy GAC w stosunku do KGA (Ryc.V.3.). Podobny wzór ekspresji poszczególnych izoform GA zaobserwowano w guzach *ependymoma*: 3 z 6 przebadanych przypadków ekspresyowały śladowe ilości transkryptu *LGA*, w 3 pozostałych przypadkach *LGA* nie ulegała ekspresji, natomiast we wszystkich 6 guzach *ependymoma* zaobserwowano nadekspresję izoformy GAC w stosunku do KGA (Ryc. V.4.). W 1 z 2 przebadanych przypadków *SEGA* zaobserwowano śladowe ilości transkryptu *LGA*, natomiast w drugim przypadku gen *LGA* nie ulegał ekspresji. W obu przypadkach zaobserwowano nadekspresję izoformy GAC w stosunku do KGA (Ryc.V.5.).

Inny wzór ekspresji izoform GA prezentowały guzy neuronalno-glejowe: *ganglioglioma* oraz pojedynczy przypadek *oligodendroglioma*. We wszystkich przebadanych przypadkach *ganglioglioma* zaobserwowano nadekspresję izoformy GAC w stosunku do KGA oraz znamienne niższą, ale znaczącą pulę transkryptu genu *LGA* (Ryc.V.6.). Podobnie *oligodendroglioma* charakteryzował się nadekspresją GAC w stosunku do KGA oraz niską ilością transkryptu *LGA* (Ryc.V.7.).

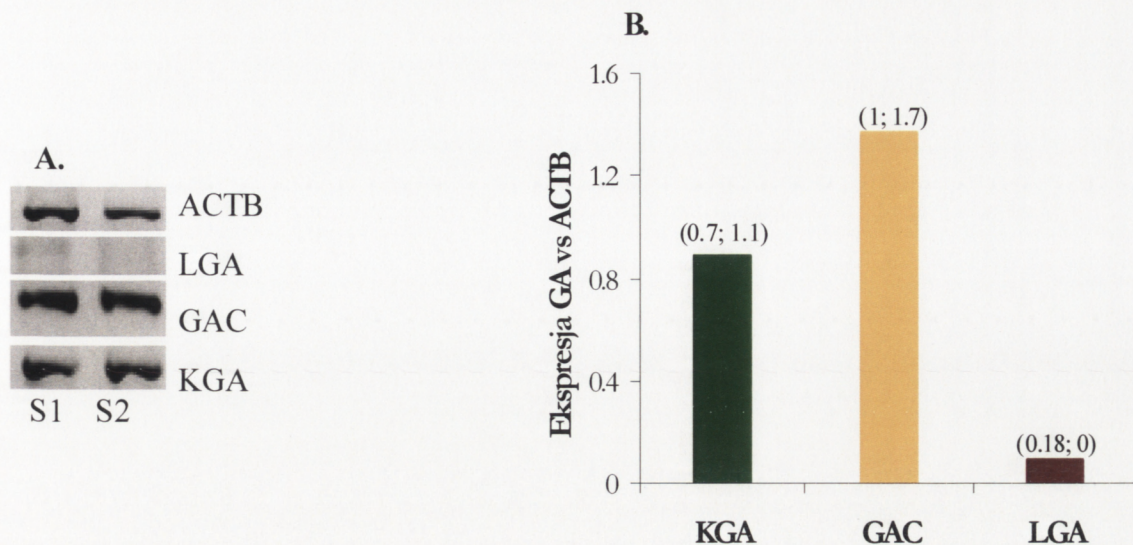
We wszystkich 3 przebadanych fragmentach kory mózgowej pochodzących od pacjentów z padaczką izoformy GA wykazały podobny poziom ekspresji (Ryc.V.8.).



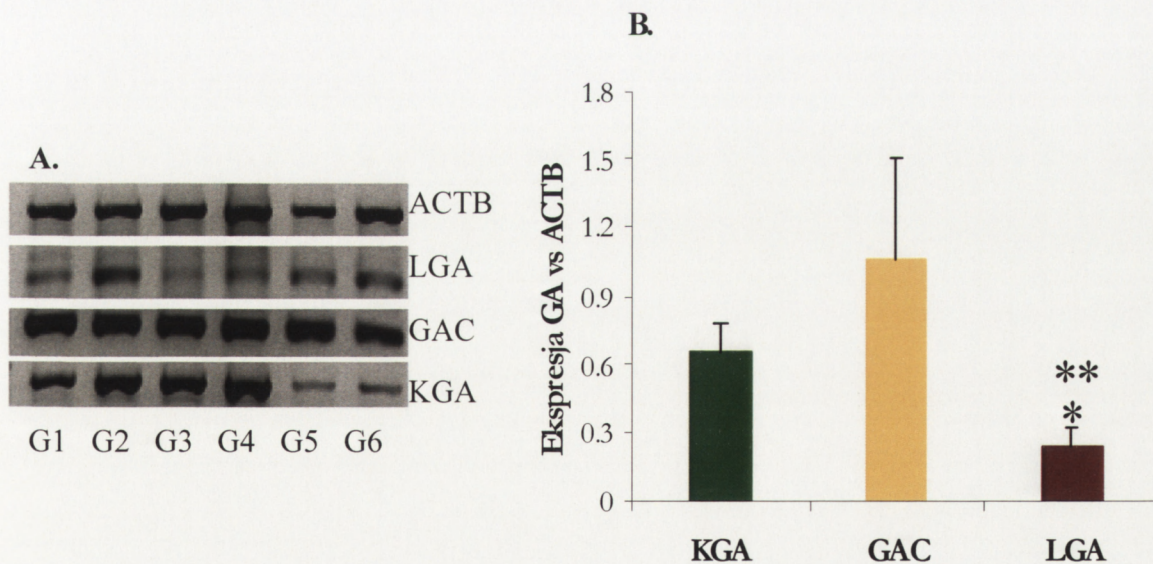
**Ryc. V.3. Ekspresja izoform GA w *pilocytic astrocytoma*.** **A.** Reprezentatywny rozdział elektroforetyczny produktów RT-PCR dla genów: *ACTB*, *LGA*, *GAC* i *KGA*. A1-A6 – poszczególne przypadki *pilocytic astrocytoma*. **B.** Poziom ekspresji izoform mierzonej względem poziomu ekspresji genu *ACTB*. Wyniki przedstawiono jako średnią z 6 przypadków  $\pm$  SD. Dla każdej tkanki wykonano 3 niezależne izolacje RNA. \*  $p < 0.05$  w stosunku do KGA, \*\*  $p < 0.001$  w stosunku do GAC (Test Manna-Whitney'a).



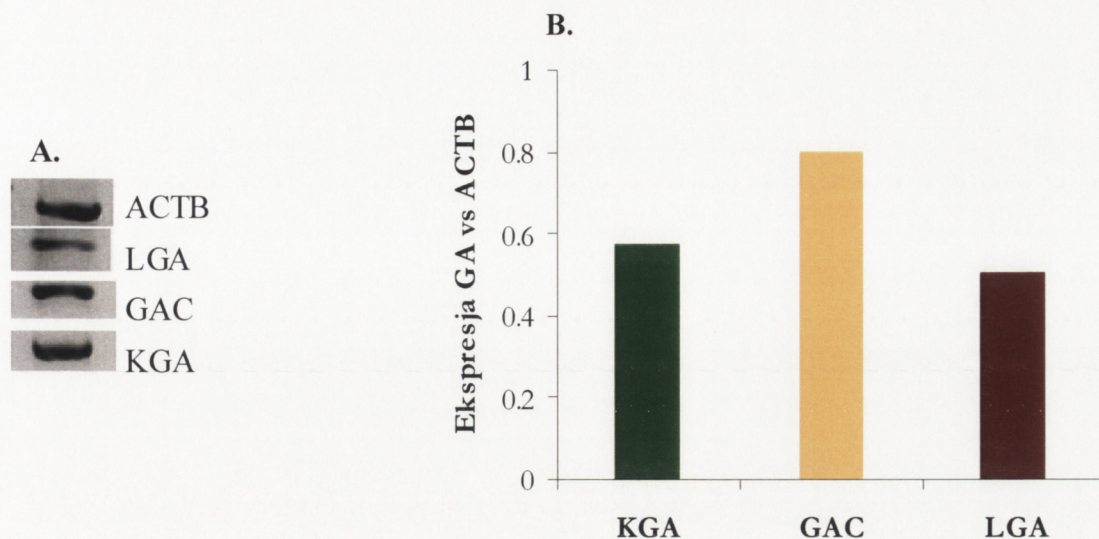
**Ryc. V.4. Ekspresja izoform GA w *ependymoma*.** **A.** Reprezentatywny rozdział elektroforetyczny produktów RT-PCR dla genów: *ACTB*, *LGA*, *GAC* i *KGA*. E1-E6 – poszczególne przypadki *ependymoma*. **B.** Poziom ekspresji izoform mierzonej względem poziomu ekspresji genu *ACTB*. Wyniki przedstawiono jako średnią z 6 przypadków  $\pm$  SD. Dla każdej tkanki wykonano 3 niezależne izolacje RNA. \*  $p < 0.001$  w stosunku do GAC; \*\*  $p < 0.01$  w stosunku do KGA (Test Manna-Whitney'a).



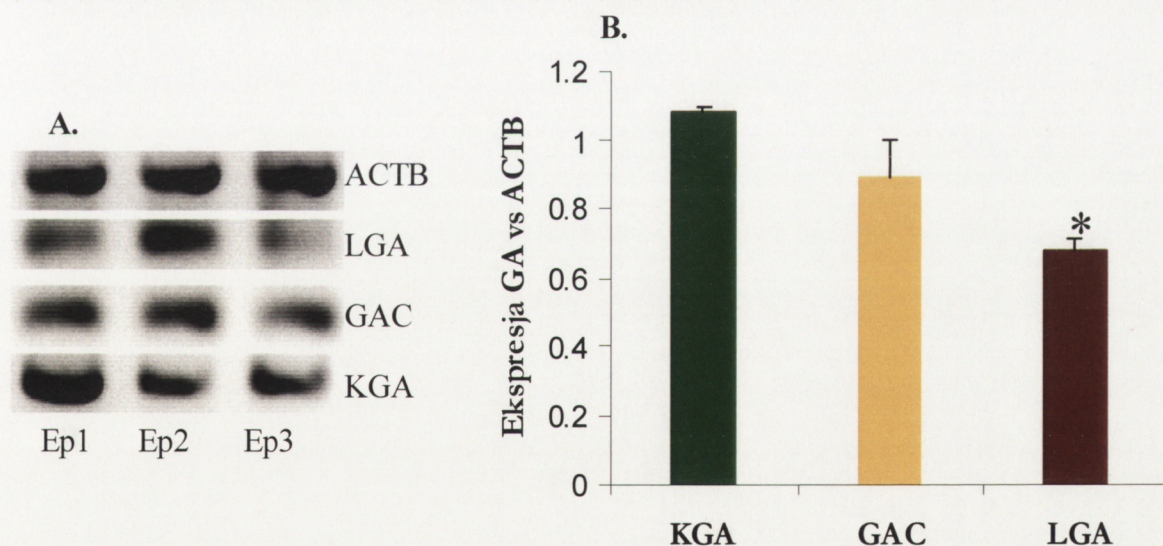
**Ryc. V.5. Ekspresja izoform GA w SEGA.** **A.** Reprezentatywny rozdział elektroforetyczny produktów RT-PCR dla genów: *ACTB*, *LGA*, *GAC* i *KGA*. S1-S2 – poszczególne przypadki SEGA. **B.** Poziom ekspresji izoform mierzonej względem poziomu ekspresji genu *ACTB*. Wyniki przedstawiono jako średnią z 2 przypadków. W nawiasach podano wartości uzyskane dla poszczególnych tkanek. Dla każdej tkanki wykonano 3 niezależne izolacje RNA.



**Ryc. V.6. Ekspresja izoform GA w glioglioma.** **A.** Reprezentatywny rozdział elektroforetyczny produktów RT-PCR dla genów: *ACTB*, *LGA*, *GAC* i *KGA*. G1-G6 – poszczególne przypadki glioglioma. **B.** Poziom ekspresji izoform mierzonej względem poziomu ekspresji genu *ACTB*. Wyniki przedstawiono jako średnią z 6 przypadków  $\pm$  SD. Dla każdej tkanki wykonano 3 niezależne izolacje RNA. \*  $p < 0.05$  w stosunku do KGA; \*\*  $p < 0.001$  w stosunku do GAC (Test Manna-Whitney'a).



**Ryc. V.7. Ekspresja izoform GA w oligodendroglioma.** **A.** Reprezentatywny rozdział elektroforetyczny produktów RT-PCR dla genów: *ACTB*, *LGA*, *GAC* i *KGA*. **B.** Poziom ekspresji izoform mierzony względem poziomu ekspresji genu *ACTB*. Wyniki przedstawiono jako średnią z 3 niezależnych izolacji RNA.

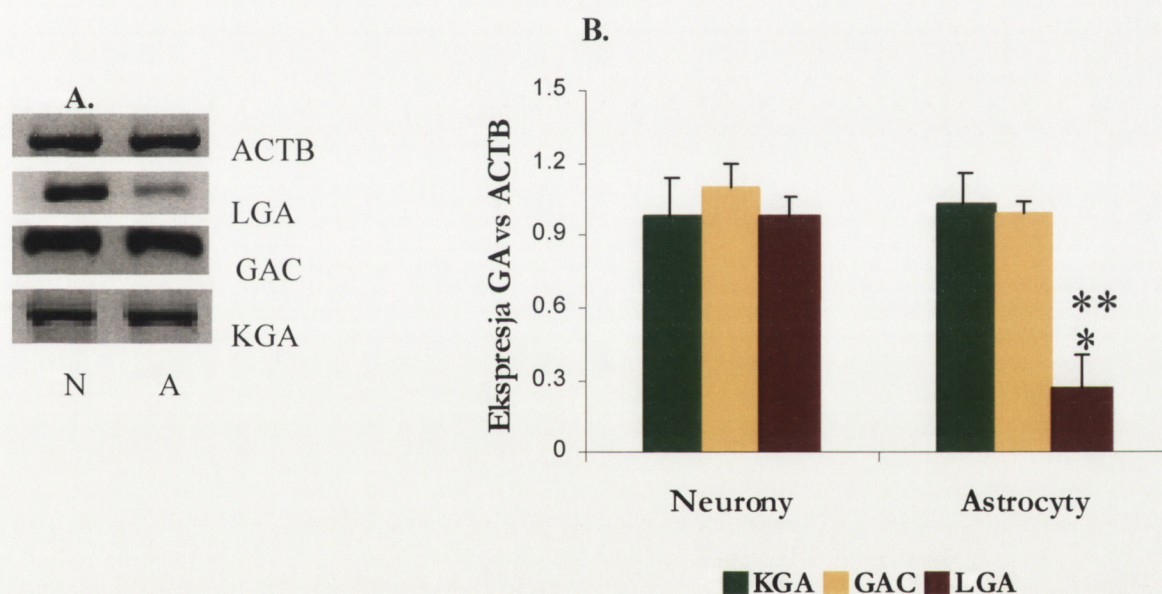


**Ryc. V.8. Ekspresja izoform GA w korze mózgowej.** **A.** Reprezentatywny rozdział elektroforetyczny produktów RT-PCR dla genów: *ACTB*, *LGA*, *GAC* i *KGA*. Ep1-Ep3 – poszczególne tkanki. **B.** Poziom ekspresji izoform mierzony względem poziomu ekspresji genu *ACTB*. Wyniki przedstawiono jako średnią z 3 przypadków  $\pm$  SD. Dla każdej tkanki wykonano 3 niezależne izolacje RNA. \*  $p < 0.05$  vs pozostałe izoformy GA (Test Manna-Whitney'a).



## V.2. Ekspresja izoform glutaminazy w szczurzych astrocytach i neuronach

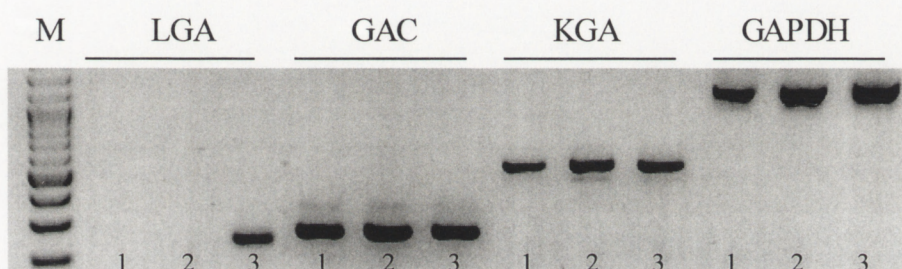
W celu potwierdzenia hipotezy, że niski poziom mRNA kodującego LGA jest cechą charakterystyczną astrocytów, przeprowadzono analizę ekspresji mRNA poszczególnych izoform glutaminazy w szczurzych astrocytach i neuronach korowych pochodzących z hodowli pierwotnych. Poziom ekspresji LGA był ponad 3-krotnie niższy w astrocytach w porównaniu do poziomu ekspresji pozostałych izoform GA oraz do poziomu ekspresji LGA w neuronach. Nie zaobserwowano znamienych statystycznie różnic w poziomach transkryptów KGA i GAC pomiędzy astrocytami i neuronami (Ryc.V.9.).



**Ryc. V.9. Ekspresja izoform GA w szczurzych neuronach i astrocytach pochodzących z hodowli pierwotnych.** **A.** Reprezentatywny rozdział elektroforetyczny produktów RT-PCR dla genów: *ACTB*, *LGA*, *GAC* i *KGA*. N – neurony, A – astrocyty. **B.** Poziom ekspresji izoform mierzony względem poziomu ekspresji genu *ACTB*. Wyniki przedstawiono jako średnią z 3 niezależnych hodowli komórkowych  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  w stosunku do pozostałych izoform GA; \*\*  $p < 0.001$  w stosunku do *LGA* w neuronach (Test Manna-Whitney'a).

### V.3. Transfekcja komórek linii glejaka ludzkiego T98G

W celu zbadania potencjalnej roli LGA w kształtowaniu fenotypu glejopochodnych komórek nowotworowych, komórki linii T98G zostały poddane transfekcji wektorem pLGA zawierającym pełną sekwencję cDNA kodującego ludzką LGA lub pustym wektorem pcDNA3. Analiza RT-PCR wykazała ekspresję mRNA kodującego LGA w linii TLGA oraz brak ekspresji tego mRNA w liniach kontrolnych TpcDNA i T98G (Ryc.V.10.). Nie zaobserwowano znamiennych statystycznie różnic w poziomach ekspresji mRNA KGA i GAC pomiędzy badanymi liniami.



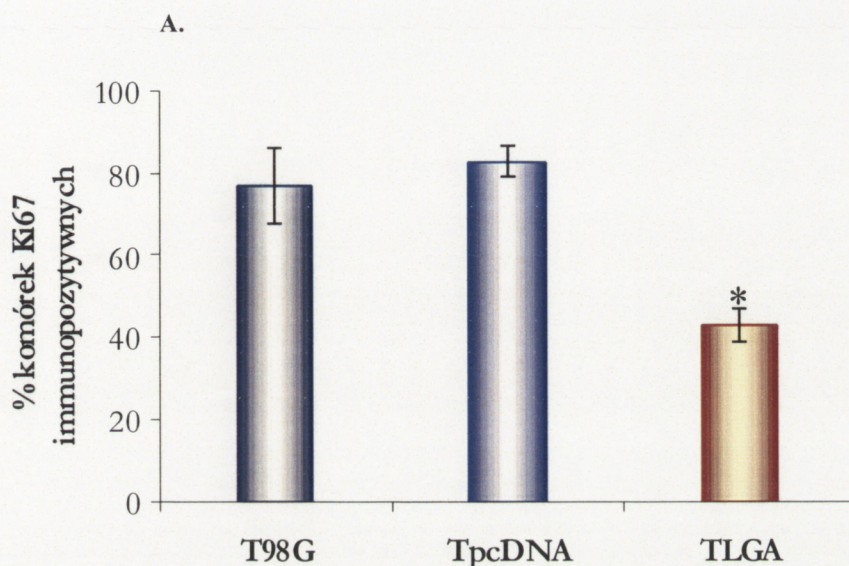
Ryc. V.10. Analiza ekspresji izoform GA w liniach komórkowych. 1 – T98G; 2 – TpcDNA; 3 – TLGA. Jako wewnętrzną kontrolę zastosowano gen *GAPDH*. M – marker wielkości.

### V.4. Wpływ transfekcji sekwencją kodującą LGA na wzrost i przeżywalność oraz zdolności migracyjne komórek linii T98G

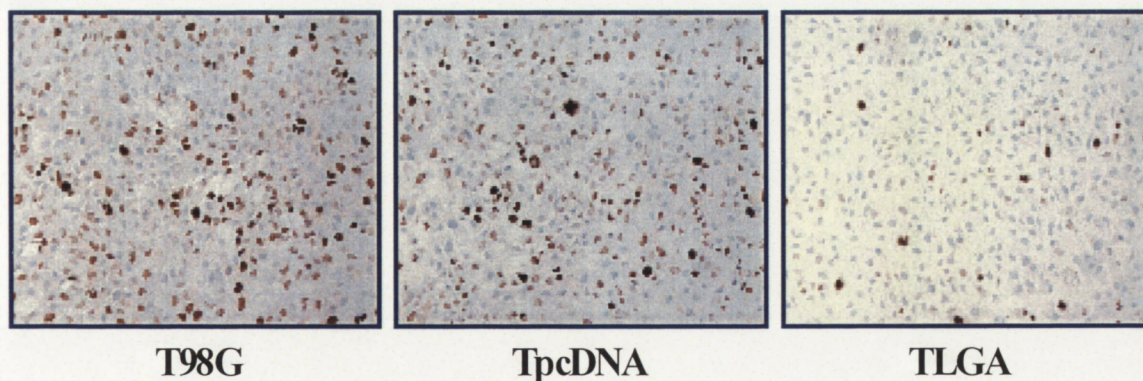
Komórki linii TLGA oraz linii kontrolnych poddano testom weryfikującym ich zdolności proliferacyjne i przeżywalność. Testy przeprowadzono na komórkach z kolejnych pasaży, przy czym po każdym pasażu potwierdzano ekspresję genu *LGA* w badanych komórkach metodą RT-PCR.

## V.4.1. Indeks proliferacji

Indeks proliferacji (IP) mierzony poziomem ekspresji antygenu Ki-67 był z namiennie niższy w komórkach linii TLGA w porównaniu do komórek linii kontrolnych i wynosił: 43% dla komórek linii TLGA, 83% dla komórek linii TpcDNA i 77% dla komórek linii T98G. (Ryc.V.11.).



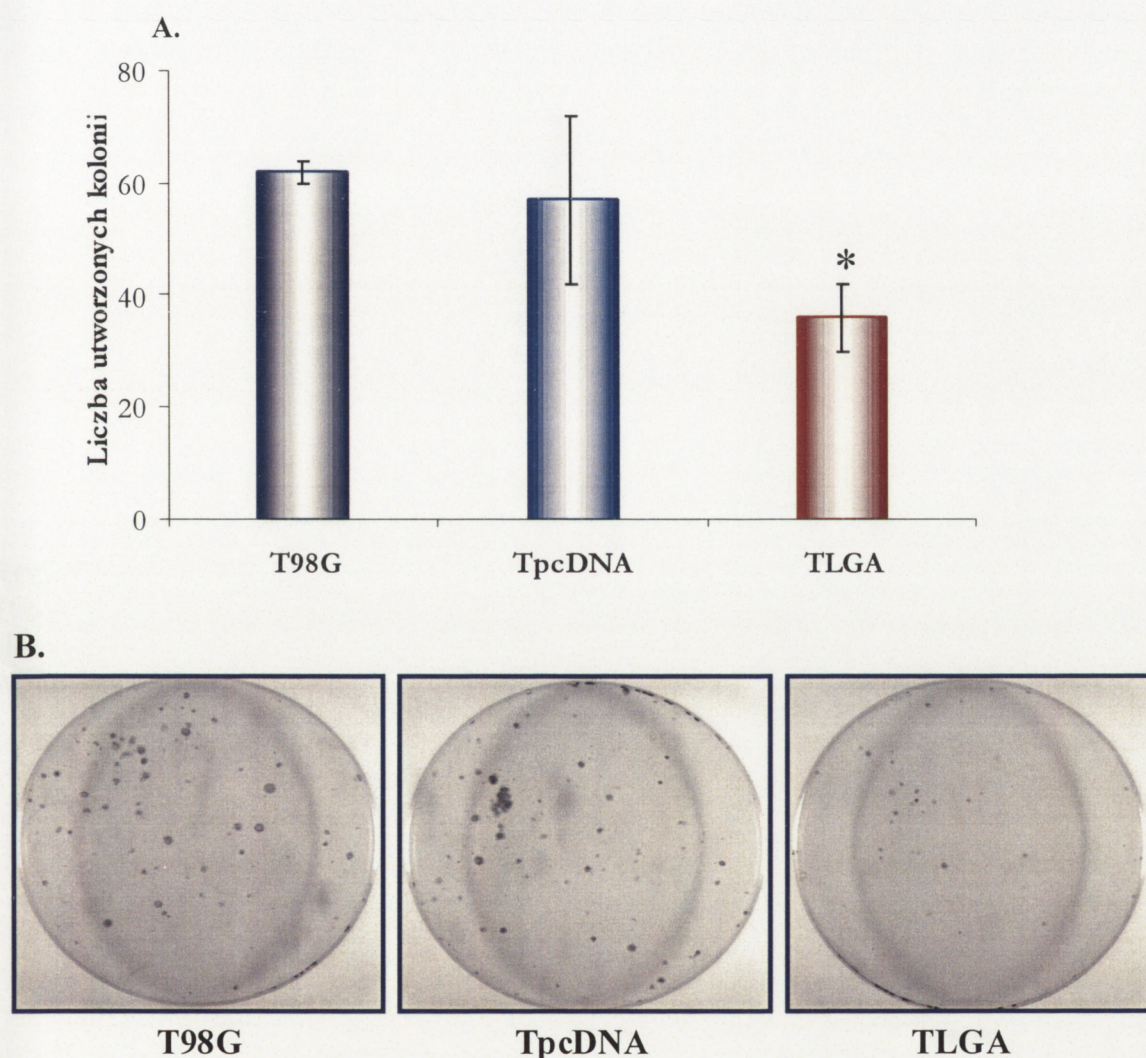
## B.



Ryc. V.11. Wpływ transfekcji sekwencją kodującą LGA na aktywność proliferacyjną komórek mierzona poziomem ekspresji jądrowego markera proliferacji Ki67. A. Procent komórek wykazujących ekspresję Ki67 w przeliczeniu na 1000 komórek analizowanych. Wyniki przedstawiono jako średnią z 3 niezależnych doświadczeń  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  w stosunku do T98G i TpcDNA (Test Manna-Whitney'a). B. Zdjęcia z mikroskopu świetlnego, x 20.

#### V.4.2. Test formowania kolonii

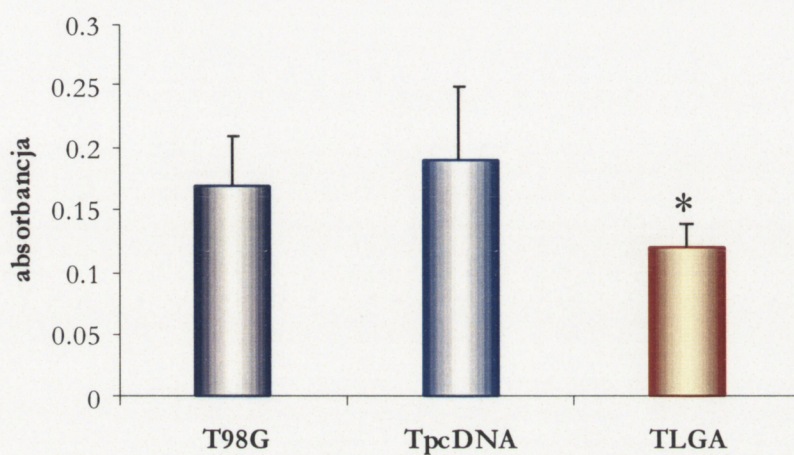
Komórki linii TLGA wykazały znamiennie niższą zdolność do formowania kolonii w porównaniu do komórek kontrolnych. Średnia liczba kolonii utworzonych po 15 dniach hodowli wynosiła: 36 w przypadku linii TLGA, 57 w przypadku linii TpcDNA oraz 62 w przypadku linii T98G (Ryc.V.12.).



**Ryc. V.12. Wpływ transfekcji sekwencją kodującą LGA na zdolność komórek T98G do formowania kolonii. A.** Liczba kolonii uformowanych po 15 dniach hodowli. Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych doświadczeń  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  w stosunku do T98G i TpcDNA (Test Manna-Whitney'a). **B.** Przykładowe płytki z koloniami uformowanymi po 15 dniach hodowli.

### V.4.3. Przeżywalność komórek

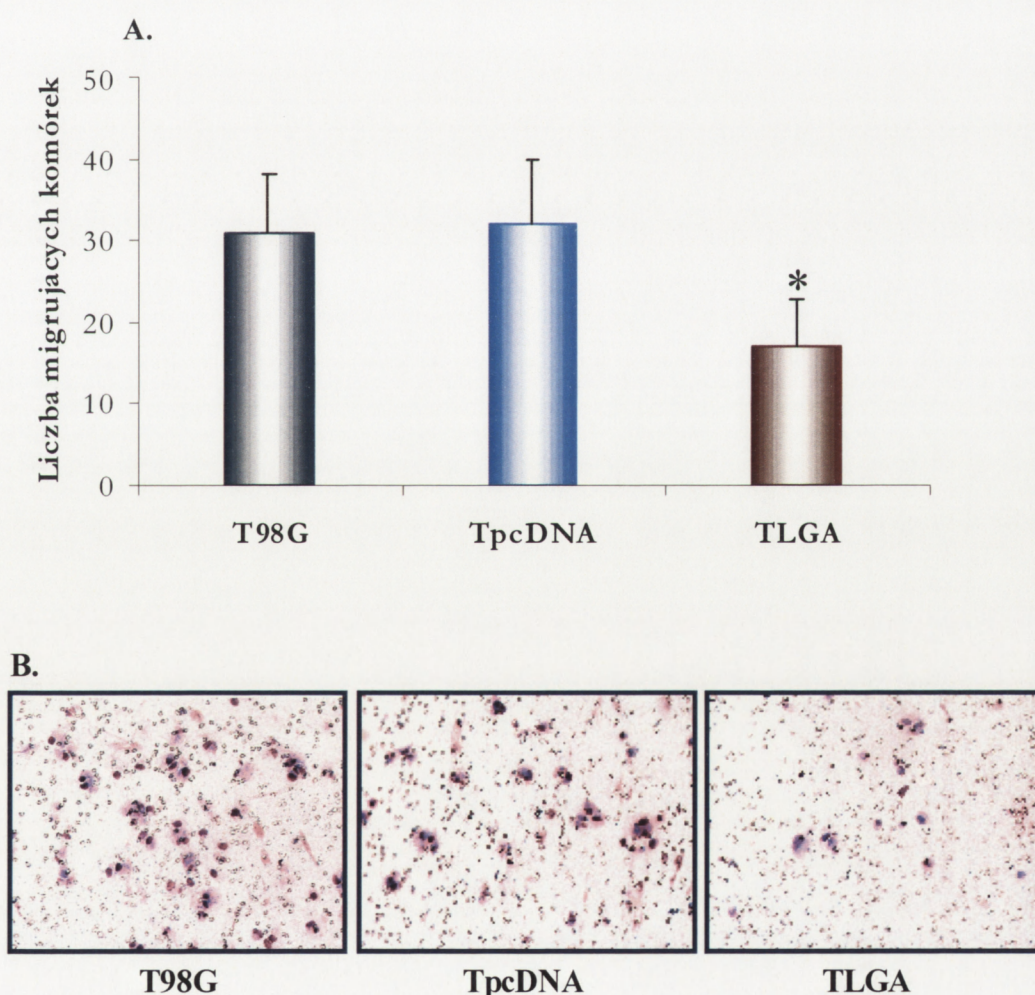
Przeżywalność komórek TLGA mierzona za pomocą testu MTT była znacząco niższa – o 27% - w porównaniu do komórek linii kontrolnych. (Ryc.V.13.).



**Ryc. V.13. Wpływ transfekcji sekwencją kodującą LGA na przeżywalność komórek T98G mierzona za pomocą testu MTT.** Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych doświadczeń  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  w stosunku do T98G i TpcDNA (Test Manna-Whitney'a).

#### V.4.4. Wpływ transfekcji sekwencją kodującą LGA na zdolności migracyjne komórek linii T98G

W celu sprawdzenia potencjalnego wpływu transfekcji sekwencją kodującą LGA na zdolności migracyjne komórek T98G przeprowadzono test migracji komórek przez membranę o 8- $\mu$ m porach. Uzyskane dane wykazały, że migracja była znacząco niższa w przypadku komórek linii TLGA w porównaniu do komórek linii kontrolnych. Po nocnej inkubacji średnia liczba komórek, które uległy migracji przez membranę wynosiła: 17 dla linii TLGA, 32 dla linii TpcDNA oraz 31 dla linii T98G (Ryc.V.14.).



**Ryc. V.14. Wpływ transfekcji sekwencją kodującą LGA na zdolności migracyjne komórek T98G. A.** Liczba komórek migrujących przez membranę po nocnej inkubacji. Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych doświadczeń  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  w stosunku do T98G i TpcDNA (Test Manna-Whitney'a). **B.** Zdjęcia z mikroskopu świetlnego, x 20.

## V.6. Wpływ transfekcji sekwencją kodującą LGA na ekspresję genów w komórkach linii T98G

### V.6.1. Analiza ekspresji genów z zastosowaniem mikromacierzy

Dane literaturowe przedstawione we **Wstępie** sugerują, że LGA może wpływać na proces transkrypcji genów. W celu potwierdzenia tej hipotezy przeprowadzono analizę ekspresji genów w komórkach linii TLGA i linii kontrolnych wykorzystując technikę mikromacierzy DNA. Aby uzyskać możliwie pełny i obiektywny obraz ekspresji genów, zastosowano jedną z największych obecnie dostępnych mikromacierzy, HG-U133 2.0 Array, zawierającą ponad 47000 transkryptów dla ponad 38000 genów.

Analiza otrzymanych wyników ujawniła 85 genów wykazujących znamienne statystycznie różnice w poziomach ekspresji między badanymi liniami. Wśród 50 genów wykazujących podwyższony poziom ekspresji w komórkach TLGA (Tab. V.1.A.) znajdują się między innymi geny kodujące: czynniki transkrypcyjne (*GATA3*, *ELF1*, *MAX*), białka transporterowe (*VAMP8*, *ATP7B*, *SLC19A2*, *SLC30A5*), białka związane z metabolizmem innych białek (*PARP11*, *USP37*) oraz białka uczestniczące w transdukcji sygnału (*ADM*, *SOCS6*). Wśród 35 genów, których poziom ekspresji jest niższy w komórkach TLGA (Tab. V.1.B.), znajdują się między innymi geny kodujące: inhibitory metaloproteinaz (*TIMP1*, *TIMP4*), białka zaangażowane w naprawę DNA (*MGMT*), białka transporterowe (*GJA1*) oraz białka strukturalne i motoryczne (*COL1A2*, *COL8A2*, *DYNC1L1*).

**Tabela. V.1. Geny wykazujące znamienne statystycznie różnice w poziomie ekspresji między komórkami TLGA a komórkami T98G i TpcDNA. A. Geny wykazujące podwyższony poziom ekspresji w komórkach TLGA w stosunku do komórek kontrolnych. B. Geny wykazujące obniżony poziom ekspresji w komórkach TLGA w stosunku do komórek kontrolnych. Wytłuszczono geny, dla których  $p < 0.001$ , pozostałe geny wykazują  $p < 0.005$ .**

## A.

Symbol genu (GenBank)	Nazwa genu (GenBank)	Numer sondy (Affymetrix)	p (test T)	Średni poziom ekspresji w linii kontrolnej	Średni poziom ekspresji w linii TLGA	Stosunek średnich poziomów ekspresji
<i>VAMP8</i>	vesicle-associated membrane protein 8 (endobrevin)	202546_at	1.18E-05	10.25	138.04	0.07
<i>ATP7B</i>	ATPase, Cu <sup>++</sup> transporting, beta polypeptide	204624_at	6.20E-05	5.50	7.20	0.76
<i>MLLT10</i>	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to,10	230122_at	8.29E-05	14.94	19.69	0.76
<i>DOPEY1</i>	dopey family member 1	213271_s_at	9.69E-05	14.52	24.44	0.59
<i>HBS1L</i>	HBS1-like (S. cerevisiae)	209314_s_at	0.000149	191.98	284.32	0.68
<i>NA</i>	NA	229928_at	0.000287	6.44	7.68	0.84
<i>CFH</i>	complement factor H	213800_at	0.0003978	5.58	8.87	0.63
<i>FLJ33297</i>	hypothetical gene supported by AK090616	1558308_at	0.0004165	636.89	1144.58	0.56
<i>NA</i>	Transcribed locus	235386_at	0.0007862	6.24	7.00	0.89
<i>C14orf100</i>	chromosome 14 open reading frame 100	223547_at	0.0008146	41.21	54.77	0.75
<i>FNDC3B</i>	fibronectin type III domain containing 3B	222692_s_at	0.0009537	211.67	337.12	0.63
<i>GATA3</i>	GATA binding protein 3	209602_s_at	0.00105	11.16	27.19	0.41
<i>SLC19A2</i>	solute carrier family 19 (thiamine transporter), member 2	209681_at	0.0010778	58.97	87.31	0.68
<i>SKP1A</i>	S-phase kinase-	200718_s_at	0.0012413	14765.22	16834.12	0.88



	associated protein 1A (p19A)					
<i>SLC30A5</i>	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 5	220181_x_at	0.0013419	11.46	13.54	0.85
<i>ELF1</i>	E74-like factor 1 (ets domain transcription factor)	212418_at	0.0015208	198.62	218.59	0.91
<i>MAX</i>	MYC associated factor X	214108_at	0.0015276	6.00	6.46	0.93
LOC388114	Hypothetical LOC388114	225567_at	0.0017184	99.47	158.57	0.63
<i>USP37</i>	ubiquitin specific peptidase 37	226730_s_at	0.0017574	74.89	88.36	0.85
<i>NA</i>	NA	230321_at	0.0018571	6.35	9.28	0.68
<i>SLITRK6</i>	SLIT and NTRK-like family, member 6	232481_s_at	0.0019195	9.03	56.73	0.16
<i>TRIM39</i>	tripartite motif-containing 39	222732_at	0.0020541	79.37	109.95	0.72
<i>FBXL14</i>	F-box and leucine-rich repeat protein 14	213145_at	0.0021032	253.10	388.12	0.65
<i>ELAVL2</i>	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 2 (Hu antigen B)	228260_at	0.0021203	14.87	67.00	0.22
<i>MAGEE1</i>	melanoma antigen family E, 1	1556047_s_at	0.0021365	100.28	142.00	0.71
<i>NA</i>	NA	231184_at	0.0021522	7.62	10.19	0.75
<i>ANKRD57</i>	ankyrin repeat domain 57	219496_at	0.002274	34.24	38.46	0.89
<i>NA</i>	CDNA FLJ31889 fis, clone NT2RP7003091	1557265_at	0.0023682	7.31	8.78	0.83
<i>RAD52</i>	RAD52 homolog (S. cerevisiae)	211904_x_at	0.0024573	5.38	5.44	0.99
<i>CACNB1</i>	calcium channel, voltage-dependent, beta 1 subunit	210967_x_at	0.0024753	5.10	5.19	0.98
<i>SNAP23</i>	synaptosomal-associated protein, 23kDa	209130_at	0.0025472	908.47	1076.29	0.84
<i>C2orf10</i>	chromosome 2 open reading frame 10	215767_at	0.0029069	13.98	31.98	0.44
<i>ISOC1</i>	isochorismatase domain containing 1	218170_at	0.0029083	607.32	838.24	0.72
<i>NA</i>	Transcribed locus	237753_at	0.0029671	11.85	15.29	0.77

<i>PITPNA</i>	Phosphatidylinositol transfer protein, alpha	239124_at	0.0030821	6.64	7.73	0.86
<i>KIAA0999</i>	KIAA0999 protein	204157_s_at	0.0034912	67.75	84.62	0.80
<i>SOCS6</i>	suppressor of cytokine signaling 6	206020_at	0.0037291	29.03	38.35	0.76
<i>ADM</i>	adrenomedullin	202912_at	0.0037466	4607.56	6601.44	0.70
<i>SCC-112</i>	SCC-112 protein	212140_at	0.003751	253.08	308.97	0.82
<i>F3</i>	coagulation factor III(thromboplastin, tissue factor)	204363_at	0.0038246	195.82	569.47	0.34
<i>KIAA0746</i>	KIAA0746 protein	235353_at	0.0039182	5.90	5.98	0.99
<i>NA</i>	CDNA: FLJ22256 fis, clone HRC02860	227955_s_at	0.003969	11.21	23.12	0.48
<i>PIN1L</i>	protein (peptidylprolyl cis/trans isomerase) NIMA-interacting 1-like	207582_at	0.0040549	15.81	15.99	0.99
<i>PARP11</i>	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 11	229138_at	0.0040751	81.70	110.28	0.74
<i>LOC643982</i>	Hypothetical protein LOC643982	231305_at	0.0041587	36.56	43.39	0.84
<i>ATP4B</i>	ATPase, H+/K+ exchanging, beta polypeptide	1563407_x_at	0.0043037	5.07	5.12	0.99
<i>NA</i>	Clone 114 tumor rejection antigen	226886_at	0.0043901	211.35	333.91	0.63
<i>C10orf118</i>	chromosome 10 open reading frame 118	229399_at	0.0043904	6.77	7.47	0.91
<i>CACHD1</i>	Cache domain containing 1	243416_at	0.0045259	15.59	17.39	0.90
<i>NA</i>	Transcribed locus, strongly similar to NP_612442.1 hypothetical protein BC009980 [Homo sapiens]	236285_at	0.004812	19.44	39.10	0.50

## B.

Symbol genu (GenBank)	Nazwa genu (GenBank)	Numer sondy (Affymetrix)	p (test T)	Średni poziom ekspresji w linii kontrolnej	Średni poziom ekspresji w linii TLGA	Stosunek średnich poziomów ekspresji
S100A16	<b>S100 calcium binding protein A16</b>	227998_at	<b>4.57E-05</b>	<b>654.51</b>	<b>116.50</b>	<b>5.62</b>
<i>CAPN2</i>	<b>calpain 2, (m/II) large subunit</b>	208683_at	<b>4.60E-05</b>	<b>3821.29</b>	<b>2971.65</b>	<b>1.29</b>
<i>EFS</i>	<b>embryonal Fyn-associated substrate</b>	204400_at	<b>0.000306</b>	<b>76.33</b>	<b>11.77</b>	<b>6.48</b>
<i>CD58</i>	<b>CD58 molecule</b>	216942_s_at	<b>0.0003272</b>	<b>238.06</b>	<b>171.79</b>	<b>1.39</b>
<i>TRIM32</i>	<b>tripartite motif-containing 32</b>	203846_at	<b>0.000575</b>	<b>157.54</b>	<b>131.70</b>	<b>1.20</b>
<i>COL8A2</i>	<b>collagen, type VIII, alpha 2</b>	52651_at	<b>0.0008354</b>	<b>7.19</b>	<b>6.63</b>	<b>1.08</b>
<i>LPP</i>	LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma	233824_at	0.0010711	44.42	28.99	1.53
<i>GJA1</i>	gap junction protein, alpha 1, 43kDa (connexin 43)	201667_at	0.0011556	637.34	27.97	22.78
<i>DYNC1LI1</i>	dynein, cytoplasmic 1, light intermediate chain 1	222479_s_at	0.0011568	593.41	444.14	1.34
<i>MAPKAPK3</i>	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3	202787_s_at	0.0012826	41.29	27.42	1.51
<i>HOM-TES-103</i>	hypothetical protein LOC25900, isoform 3	209721_s_at	0.0012976	93.66	71.47	1.31
<i>TIMP4</i>	TIMP metalloproteinase inhibitor 4	206243_at	0.0015049	129.61	10.11	12.82
<i>C1orf71</i>	chromosome 1 open reading frame 71	225551_at	0.0017514	42.34	32.58	1.30
<i>RYK</i>	RYK receptor-like tyrosine kinase	202853_s_at	0.001875	800.24	637.77	1.25
<i>TAL1</i>	T-cell acute	1561651_s_at	0.0021572	6.15	5.34	1.15

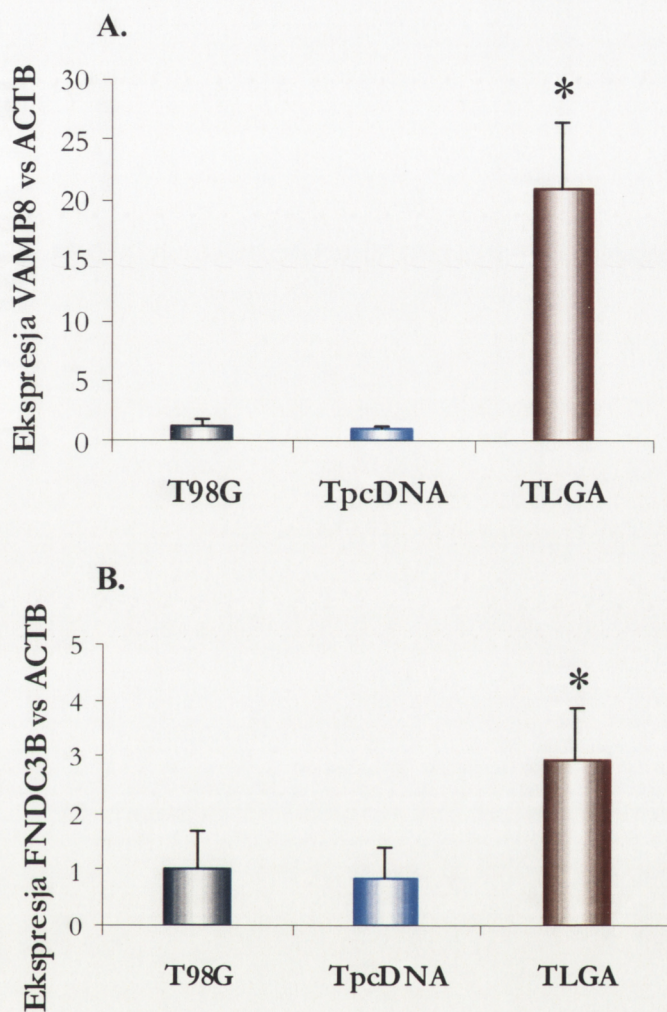
	lymphocytic leukemia 1					
<i>WDR6</i>	WD repeat domain 6	217734_s_at	0.0024868	373.28	272.55	1.37
<i>STOM</i>	stomatin	201061_s_at	0.0026298	325.58	190.18	1.71
<i>CD58</i>	CD58 molecule	211744_s_at	0.0028754	147.69	105.94	1.39
<i>FHL2</i>	four and a half LIM domains 2	202949_s_at	0.0029141	2227.50	1325.47	1.68
<i>COL1A2</i>	collagen, type I, alpha 2	202403_s_at	0.0029193	6107.40	1651.50	3.70
<i>C21orf57</i>	chromosome 21 open reading frame 57	227421_at	0.0030049	175.92	140.60	1.25
<i>LEPROTL1</i>	leptin receptor overlapping transcript-like 1	202595_s_at	0.0031507	494.00	338.47	1.46
<i>MGMT</i>	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	204880_at	0.0032612	79.03	19.99	3.95
<i>SDC2</i>	syndecan 2 (heparan sulfate proteoglycan 1, cell surface-associated, fibroglycan)	212154_at	0.0035682	92.71	36.18	2.56
<i>TCEAL8</i>	transcription elongation factor A (SII)-like 8	224819_at	0.0039162	180.16	72.20	2.50
<i>CAB39</i>	calcium binding protein 39	217873_at	0.0043158	823.00	680.33	1.21
<i>FBLIM1</i>	filamin binding LIM protein 1	225258_at	0.0043575	100.50	12.09	8.32
<i>TIMP1</i>	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	201666_at	0.0044154	2316.43	1730.77	1.34
<i>FKSG49</i>	FKSG49	211454_x_at	0.0044204	149.09	103.76	1.44
<i>STOM</i>	stomatin	201060_x_at	0.0045162	228.29	131.83	1.73
<i>LOC129293</i>	hypothetical protein LOC129293	227867_at	0.004532	15.13	10.02	1.51
<i>PPAPDC1B</i>	phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 1B	223568_s_at	0.0045339	174.75	148.29	1.18
<i>TMEM153</i>	transmembrane protein 153	31837_at	0.0046867	483.32	356.58	1.36
<i>PRRT3</i>	Proline-rich	242888_at	0.0047755	38.29	14.20	2.70

	transmembrane protein 3					
<i>DKK3</i>	dickkopf homolog 3 ( <i>Xenopus laevis</i> )	202196_s_at	0.0048392	967.41	487.58	1.98

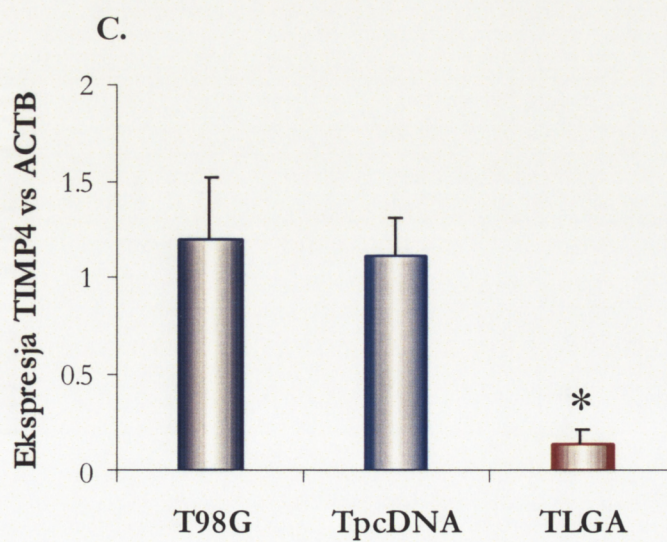
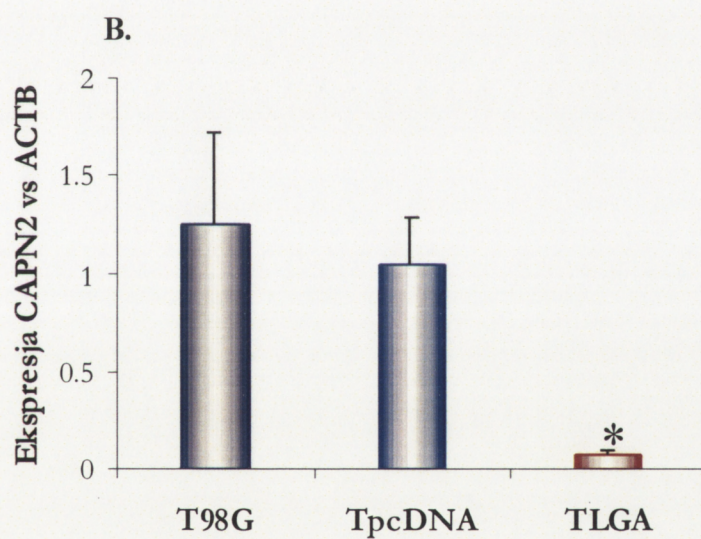
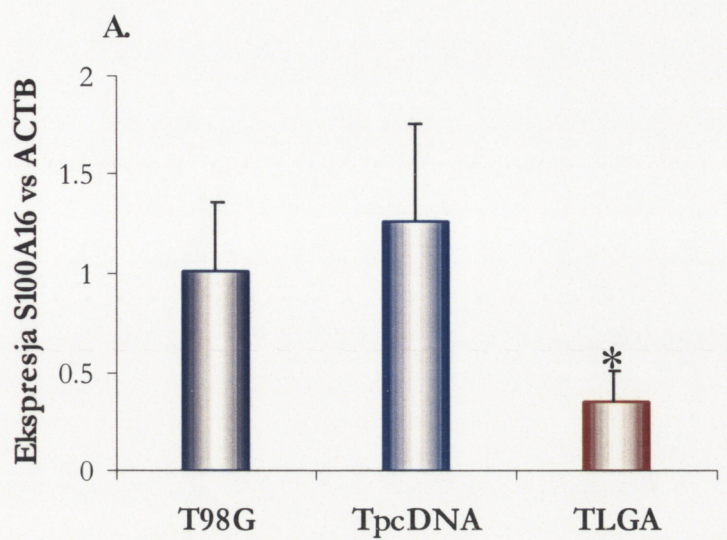
### V.6.2. Analiza ekspresji genów metodą real-time PCR

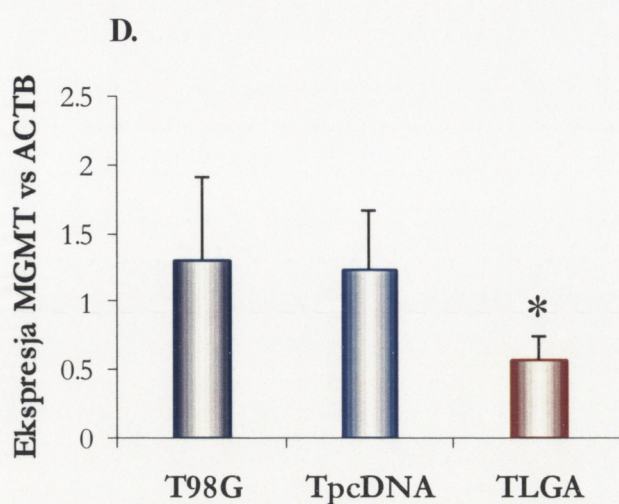
W celu weryfikacji wyników uzyskanych w analizie mikromacierzy przeprowadzono analizę ekspresji wybranych genów metodą real-time PCR. Do analizy wytypowano geny wykazujące w mikromacierzach istotne statystycznie zmiany w poziomie ekspresji pomiędzy komórkami TLGA a komórkami kontrolnymi, a jednocześnie kodujące białka potencjalnie zaangażowane w proces nowotworzenia: *S100A16*, *CAPN2*, *FNDC3B*, *DYNC1L1*, *TIMP4*, *MGMT*, *ADM* i *TIMP1*. Dodatkowo zbadano poziom ekspresji genu *VAMP8*, wykazującego w mikromacierzach największą zmianę w poziomie ekspresji między komórkami TLGA a komórkami kontrolnymi.

Analiza real-time PCR potwierdziła podwyższoną ekspresję genów *VAMP8* i *FNDC3B* (Ryc. V.15.) oraz obniżoną ekspresję genów *S100A16*, *CAPN2*, *TIMP4* i *MGMT* (Ryc. V.16.) w komórkach TLGA w porównaniu do komórek kontrolnych.



Ryc. V.15. Analiza ekspresji genów *VAMP8* (A.) i *FNDC3B* (B.) metodą real-time PCR. Wyniki przedstawiono jako średnią z 10 niezależnych izolacji RNA  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  w stosunku do T98G i TpcDNA (jednokierunkowa ANOVA i test Tukey'a).

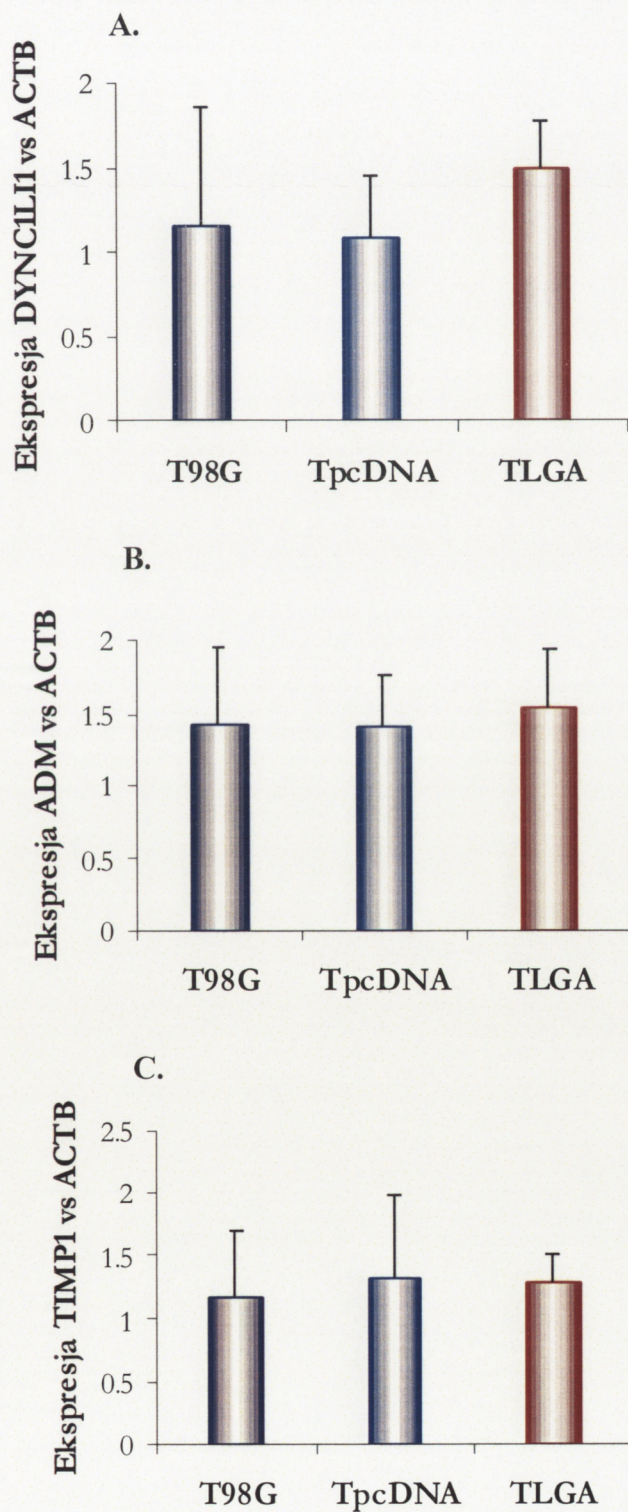




**Ryc. V.16.** Analiza ekspresji genów *S100A16* (A.), *CAPN2* (B.), *TIMP4* (C.) i *MGMT* (D.) metodą real-time PCR. Wyniki przedstawiono jako średnią z 10 niezależnych izolacji RNA  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  w stosunku do T98G i TpcDNA (jednokierunkowa ANOVA i test Tukeya).



Analiza ekspresji genów metodą real-time PCR nie potwierdziła różnic w poziomie ekspresji genów *DYNC1L1*, *ADM* i *TIMP1* (Ryc. V.17.) wykazanych w analizie z zastosowaniem mikromacierzy.



Ryc. 17.V. Analiza ekspresji genów *DYNC1L1* (A.), *ADM* (B.) i *TIMP1* (C.) metodą real-time PCR. Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych izolacji RNA  $\pm$  SD.

## VI. Dyskusja

Glutamina pełni niezwykle istotną rolę w komórkach nowotworowych – przede wszystkim jako substrat energetyczny, ale także jako źródło azotu w syntezie nukleotydów i białek oraz czynnik wzmagający proliferację, obniżający adhezyjność komórek i hamujący apoptozę (Turowski i wsp., 1994; Wasa i wsp., 1996; Spittler i wsp., 1997; Pawlik i wsp., 2000). Z tego względu GA metabolizująca glutaminę stała się przedmiotem intensywnych badań związanych z biologią nowotworów. Jak opisano we *Wstępie*, nowotwory różnego typu, a także komórki nowotworowe pochodzące z hodowli, charakteryzują się zaburzeniami w ekspresji i/lub aktywności glutaminaz.

W glejakach, poza wyżej wymienionymi funkcjami, Gln pełni dodatkowo ważną rolę jako prekursor Glu wpływającego na inwazyjność komórek (Takano i wsp., 2001) oraz GSH - w dużej mierze odpowiedzialnego za odporność glejaków na radio- i chemioterapię (Grant i Ironside, 1995; Merlo, 2003).

Badania dotyczące roli Gln i jej transportu w glejakach stanowią jedną ze ścieżek badawczych prowadzonych w Zakładzie Neurotoksykologii IMDiK PAN. Zagadnienia związane z ekspresją i funkcją GA w guzach mózgu wydają się być ważnym elementem tej ścieżki.

### *VI.1. Zaburzenia w ekspresji LGA i GAC w glejakach o najwyższym stopniu złośliwości*

Punktem wyjścia do kolejnych badań przedstawionych w niniejszej rozprawie była zaskakująca obserwacja: brak ekspresji genu *LGA* w glejakach o najwyższym stopniu złośliwości (*glioblastoma* (WHO IV) i *anaplastic astrocytoma* (WHO III)) (Ryc. V.1.; V.2.). W jednym przypadku *glioblastoma* zaobserwowano śladowe ilości transkrypty *LGA*, jednak najprawdopodobniej był to efekt zanieczyszczenia materiału zdiagnozowanego jako *glioblastoma* niewielką ilością zdrowej tkanki z obrzeża pola operacyjnego.

Dane literaturowe dostarczają licznych dowodów na wzmożoną ekspresję i/lub aktywność GA w tkankach/komórkach nowotworowych (Matsuno i Goto, 1992; Collins i wsp., 1998, Elgadi i wsp., 1999; Perez-Gomez i wsp., 2005). Nadekspresję GAC zaobserwowano w komórkach raka piersi (Elgadi i wsp., 1999), choć nie stwierdzono jej

obecności w komórkach linii chłoniaka (Perez-Gomez i wsp., 2005). Niemniej jednak, podwyższony poziom ekspresji GAC w GBM i AA (Ryc. V.1.; V.2.), a także - ujawniony w dalszych eksperymentach - w innych typach guzów OUN (Ryc. V.3 - V.7.) dobrze wpisuje się w istniejący stan wiedzy. Natomiast brak ekspresji genu *LGA* w GBM i AA zrodził hipotezę, że jest to cecha charakterystyczna dla tych nowotworów i związana z ich wysokim stopniem złośliwości. W celu potwierdzenia tej hipotezy przeprowadzono analizę ekspresji izoform GA w glejakach o niższych stopniach złośliwości i wywodzących się z innych typów komórek.

### ***VI.2. Zaburzenia w ekspresji LGA w guzach OUN o niższych stopniach złośliwości i różnym pochodzeniu***

Analiza ekspresji izoform GA w nowotworach OUN o niższych stopniach złośliwości pochodzących z różnych typów komórek wykazała brak ekspresji lub jedynie śladowe ilości transkryptu genu *LGA* w guzach pochodzenia astrocytarnego i ependymalnego (Ryc. V.3., V.4., V.5.). Jednocześnie w mieszanych guzach neuronalno-glejowych (*ganglioglioma*), *LGA* nadal była najslabiej reprezentowaną izoformą GA, ale ulegała ekspresji na znacznym poziomie we wszystkich przebadanych przypadkach (Ryc. V.6.). Także pojedynczy przypadek *oligodendroglioma* wykazywał znaczny poziom ekspresji genu *LGA* (Ryc. V.7.).

Powyższe obserwacje sugerują, że poziom ekspresji genu *LGA* nie zależy od stopnia złośliwości, natomiast jest związany z typem badanych komórek. Potwierdzeniem tej hipotezy są wyniki analizy ekspresji *LGA* w tkankach niezawierających utkania nowotworowego, pochodzących od pacjentów cierpiących na padaczkę. Tkanki te w ocenie histopatologicznej wykazały dużą ilość neuronów, a poszczególne izoformy GA, w tym *LGA*, ulegały w nich ekspresji na zbliżonym poziomie. Można zatem przyjąć, że gen *LGA* ulega w znacznym stopniu ekspresji w neuronach, natomiast poziom jego ekspresji w astrocytach jest znikomy.

### ***VI.3. Ekspresja izoform GA w szczurzych astrocytach i neuronach pochodzących z hodowli pierwotnych***

Analiza ekspresji genu *LGA* w szczurzych astrocytach i neuronach pochodzących z hodowli pierwotnych potwierdziła hipotezę zakładającą niski poziom ekspresji w

komórkach pochodzenia astrocytarnego. W szczurzych astrocytach zaobserwowano blisko 4-krotnie niższy poziom ekspresji *LGA* w porównaniu do poziomu ekspresji *LGA* w neuronach (Ryc. V.9.). Powyższe dane potwierdzają wcześniejsze doniesienia dotyczące ekspresji GA w różnych typach komórek mózgowych: udokumentowano brak immunoreaktywności względem GA w astrocytach w hipokampach szczura *in situ* (Laake i wsp., 1999), a mysie astrocyty pochodzące z hodowli wykazywały śladową immunoreaktywność względem GA (Kvamme i wsp., 2001). Także badania aktywności enzymatycznej GA dowodzą, że aktywność ta jest znacznie niższa w mysich astrocytach pochodzących z hodowli w stosunku do neuronów (Hogstad i wsp., 1988). Stąd znikomy poziom transkryptu genu *LGA* w nowotworach pochodzenia glejowego wydaje się być prostą konsekwencją jego nieobecności w gleju.

#### ***VI.4. Wpływ LGA na proliferację, przeżywalność i zdolności migracyjne komórek glioblastoma in vitro***

Observacje dotyczące niskiego poziomu ekspresji *LGA* lub wręcz braku tego transkryptu w poszczególnych typach guzów OUN zrodziły pytanie o konsekwencje tego zjawiska dla procesu nowotworzenia i/lub fizjologii komórek glejaków. W celu uzyskania odpowiedzi na to pytanie przeprowadzono szereg doświadczeń na modelu badawczym: komercyjnie dostępnej linii *glioblastoma*, T98G. W komórkach tej linii nie stwierdzono obecności transkryptu *LGA* (Ryc. V.10.). Komórki T98G poddano stabilnej transfekcji wektorem zawierającym sekwencję kodującą ludzką *LGA*. Otrzymane transfektanty (TLGA) wykazywały ekspresję *LGA* na poziomie mRNA (Ryc. V.10.). Komórki TLGA charakteryzowały się znacznie obniżoną proliferacją, zdolnością do formowania kolonii i przeżywalnością w stosunku do komórek kontrolnych T98G i TpcDNA (komórki transfekowane pustym wektorem). Także zdolności migracyjne komórek uległy obniżeniu po transfekcji sekwencją kodującą *LGA*. Otrzymane wyniki wydają się potwierdzać hipotezę postawioną przez Perez-Gomez i wsp., (2005) mówiącą, że o ile gen *KGA* ulega silnej ekspresji w komórkach intensywnie proliferujących, to ekspresja *LGA* jest charakterystyczna dla komórek o niskim potencjale proliferacyjnym.

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy pozwalają spekulować na temat związku przyczynowego pomiędzy obecnością *LGA* a proliferacją i inwazyjnością guza. Należy zaznaczyć, że podobny efekt fenotypowy - wskazujący na obniżenie złośliwego charakteru

komórek - uzyskano blokując ekspresję *KGA* w komórkach EATC (Lobo i wsp., 2000). Sugeruje to, że molekularny mechanizm zmian obserwowanych w komórkach T98G transfekowanych sekwencją kodującą LGA i w komórkach EATC transfekowanych sekwencją blokującą ekspresję genu *KGA* jest odmienny.

#### VI.5. Wpływ LGA na ekspresję genów w komórkach glioblastoma in vitro

Jądrowa lokalizacja LGA (Olalla i wsp., 2002), jej potencjalna struktura (Marquez i wsp., 2006) oraz oddziaływanie z białkami zawierającymi domenę PDZ (Olalla i wsp., 2001) – elementy opisane szerzej we **Wstępie** – sugerują, że białko to może odgrywać rolę w procesie transkrypcji genów. W prezentowanej pracy postanowiono zatem zbadać wpływ LGA na transkrypcję genów stosując technikę mikromacierzy DNA. Zastosowanie tej techniki umożliwiło kompleksową analizę profili ekspresji genów badanych komórek, która wykazała zmiany w ekspresji 85 genów w komórkach TLGA w stosunku do komórek kontrolnych, przy czym 50 genów ulegało nadekspresji, a 35 genów wykazywało obniżoną ekspresję. Do potwierdzenia wyników uzyskanych w analizie mikromacierzy wykorzystano technikę real-time PCR umożliwiającą niezwykle precyzyjną ocenę poziomu ekspresji genów. Zbadano ekspresję 8 genów (*S100A16*, *CAPN2*, *FNDC3B*, *DYNC1LI1*, *TIMP4*, *MGMT*, *ADM* and *TIMP1*) potencjalnie zaangażowanych w proces nowotworzenia oraz genu *VAMP8*, wykazującego bardzo dużą zmianę w poziomie ekspresji w komórkach TLGA w stosunku do komórek kontrolnych. Ekspresja 6 z 9 badanych genów wykazała tendencje zgodne z wynikami uzyskanymi w analizie mikromacierzy: *VAMP8* i *FNDC3B* ulegały nadekspresji, a *S100A16*, *CAPN2*, *TIMP4* i *MGMT* ulegały obniżonej ekspresji w komórkach TLGA. Zmiany w ekspresji co najmniej trzech genów wydają się współgrać z wynikami testów fizjologicznych dotyczących proliferacji i migracji badanych komórek.

Astrocytarne białko S100A16 należy do rodziny wiążących  $\text{Ca}^{2+}$  białek S100 pośrednio – poprzez oddziaływanie z białkami efektorowymi - zaangażowanych w procesy różnicowania, migracji, proliferacji, sekrecji, transkrypcji a także w progresję cyklu komórkowego (Marenholz i Heizmann, 2004; Sturchler i wsp., 2006). Ekspresja białek należących do tej rodziny jest tkankowo i komórkowo specyficzna, przy czym poszczególne białka z tej rodziny wykazują zaburzoną ekspresję w różnych typach nowotworów, dzięki czemu są wykorzystywane jako markery diagnostyczne i

prognostyczne. S100A16 ulega wzmożonej ekspresji w komórkach różnych nowotworów narządów obwodowych (Marenholz i Heizmann, 2004). Postuluje się, że transkrypt genu *S100A16* może być molekularnym markerem pojedynczych krążących we krwi komórek nowotworowych (*ang. Circulating Tumor Cells, CTC*) wykorzystywanych w diagnostyce i ocenie skuteczności terapii różnych nowotworów (Smirnov i wsp., 2005).

Gen *CAPN2* koduje m-kalpainę należącą do grupy aktywowanych jonami  $Ca^{2+}$  proteaz zaangażowanych w proces apoptozy (Demarchi i wsp., 2007), zwiększających przeżywalność komórek nowotworowych i ich migrację (Demarchi i Schneider, 2007). Kalpains mogą odgrywać istotną rolę w procesie nowotworzenia, ponieważ ich substratami są czynniki transkrypcyjne c-Jun i c-Fos, supresor nowotworowy TP53, kinaza białkowa C oraz integryna (Reichrath i wsp., 2003). W niektórych rodzajach nowotworów zaobserwowano rozregulowaną ekspresję innej izoformy kalpainsy kodowanej przez gen *CAPN1* (Reichrath i wsp., 2003).

Gen *MGMT* koduje metylotransferazę DNA O<sup>6</sup> metyloguaniny. Enzym ten odpowiada za naprawę DNA (Tubbs et al., 2007; Verbeek et al., 2008). Istnieje wiele danych dokumentujących niezwykle istotną rolę *MGMT* w procesie nowotworzenia. Także w przypadku glejaków *MGMT* pełni szereg funkcji, głównie związanych z odpornością tych guzów na radio- i chemioterapię. Epigenetyczne wyciszenie ekspresji genu *MGMT* poprzez hipermetylację promotora wiąże się z reguły z większą skutecznością chemioterapii (Idbaih i wsp., 2007; Hau i wsp., 2007; Krex i wsp., 2007; Nagane i wsp., 2007; Stupp i wsp., 2007). Zjawisko to może mieć również wartość diagnostyczną: metylacja promotora genu *MGMT* występuje znacznie częściej w glejakach o niższym stopniu złośliwości i guzach oligodendroglioma anaplasticum (Idbaih i wsp., 2007)

Obniżona ekspresja genu kodującego jeden z inhibitorów metyloproteinaz *TIMP4* w komórkach TLGA jest trudna do wyjaśnienia w świetle danych literaturowych dotyczących roli tego białka w procesie nowotworzenia. *TIMP4* postrzegany jest jako białko o właściwościach hamujących migrację komórek *in vitro* oraz wzrost guzów *in vivo* (Wang i wsp., 1997). Wykazano także silną ekspresję genu *TIMP4* w *pilocytic astrocytoma* (WHO I), guzach o wzroście ograniczonym (Biernat, 1999). Zatem obniżony poziom ekspresji *TIMP4* w komórkach TLGA kontrastuje z obserwowaną obniżoną zdolnością do migracji i proliferacji tych komórek.

Gen *FNDC3B* koduje białko błonowe zawierające domeny fibronektynowe typu III. Funkcja tego białka jest słabo poznana, brak doniesień dokumentujących jego rolę w procesie nowotworzenia. Wydaje się jednak, że domeny fibronektynowe są zaangażowane w angiogenezę (Castellani i wsp., 2002). Trudno zatem rozważać potencjalne konsekwencje zwiększonej ekspresji tego genu w prezentowanym modelu badawczym.

Gen *VAMP8* koduje endobrewinę, białko błonowe zaangażowane w egzocytozę i (Nagamatsu i wsp., 2001; Wang i wsp., 2004; Wang i wsp., 2007) i fuzję komórek (Lippert i wsp., 2007). Potencjalne zaangażowanie endobrewiny w procesy sekrecyjne trudno połączyć z obserwowanymi zmianami fizjologicznymi prezentowanymi przez komórki TLGA, jednak niezwykle silna ekspresja genu *VAMP8* w tych komórkach wydaje się być nieprzypadkowa i warta dalszej uwagi. Opisywane już wyżej komórki EATC z zablokowaną ekspresją genu *KGA* wykazują rozregulowaną ekspresję genów kodujących białka błonowe odpowiedzialne za morfologię komórki (Martin-Rufian i wsp., 2006) oraz białka związane z immunogennością komórek (Segura i wsp., 2001), co czyni je bardziej podatnymi na działanie układu immunologicznego gospodarza. Stąd obserwowane w komórkach TLGA zmiany w poziomie ekspresji genu *VAMP8*, a także *COL1A2*, *COL8A2* wydają się być spójne z fenotypem tych komórek.

#### **VI.6. LGA jako czynnik transkrypcyjny?**

Mimo wykazania wpływu transfekcji sekwencją kodującą LGA na proces transkrypcji genów, kwestia LGA jako czynnika transkrypcyjnego pozostaje nadal otwarta i wymaga dalszych intensywnych badań - tym trudniejszych, że nie istnieje komercyjnie dostępne przeciwciało anti-LGA. Konieczne jest jednak przeprowadzenie analizy lokalizacji komórkowej LGA w komórkach TLGA oraz sprawdzenie zdolności LGA do wiązania się z DNA. Tylko wykazanie obecności LGA w jądrach komórkowych i jej zdolności do interakcji z DNA pozwoli uznać to białko za czynnik transkrypcyjny.

Istnieje również możliwość, że LGA moduluje ekspresję genów pośrednio, oddziaływując z innymi białkami. Opisana we **Wstępie** zdolność LGA do wiązania się z białkami zawierającymi domenę PDZ (Olalla i wsp., 2001) wydaje się mieć znaczenie dla komórkowej lokalizacji LGA. Nie można jednak wykluczyć, że potencjalne oddziaływanie LGA z białkami zawierającymi domenę PDZ leży u podstaw zmian obserwowanych w komórkach TLGA. Jeszcze ważniejsze dla funkcjonowania LGA mogą być dwie reszty

ankirynowe zidentyfikowane w C-końcu tego białka (Marquez i wsp., 2006). Poza innymi postulowanymi funkcjami, reszty ankirynowe wydają się być niezbędnymi elementami niektórych regulatorów procesu transkrypcji, jak białko GABP czy białka ANCO, zapewniającymi prawidłowe działanie tych regulatorów (Batchelor i wsp., 1998; Zhang i wsp., 2004; 2007). W świetle tych danych rola reszt ankirynowych obecnych w LGA staje się niezmiernie istotna: z jednej strony mogą one być zaangażowane w lokalizację LGA w komórce, a z drugiej strony – mogą być odpowiedzialne za obserwowane w komórkach TLGA zmiany w transkrypcji genów.

### VI.7. Dalsze ścieżki badawcze

Podsumowując powyższe rozważania można stwierdzić, że transfekcja glijepochodnych komórek nowotworowych powoduje istotne obniżenie podstawowych parametrów fizjologicznych tych komórek, takich jak proliferacja, przeżywalność i migracja oraz zmianę w poziomie ekspresji licznych genów. Otrzymane wyniki mogą być punktem wyjścia do dalszych badań, pozwalają bowiem zbudować kilka hipotez:

► Obniżenie potencjału proliferacyjnego i zdolności do migracji komórek glioblastoma w układzie *in vitro* będzie miało swoje odzwierciedlenie w układzie *in vivo*.

Jak już opisano we **Wstępie**, zablokowanie ekspresji genu *KGA* w komórkach linii EATC spowodowało obniżenie proliferacji i przeżywalności tych komórek, a wszczepienie myszom komórek EATC-KGA nie prowadziło do rozwoju nowotworu, mimo że wszczepienie dzikich komórek EATC indukowało proces nowotworzenia (Lobo i wsp., 2000).

► Poddanie komórek TLGA działaniu czynników indukujących apoptozę, w szczególności związków alkilujących DNA, spowoduje spadek przeżywalności tych komórek.

W komórkach TLGA ekspresja *MGMT* jest znacznie obniżona w stosunku do komórek kontrolnych. Ponieważ *MGMT* jest enzymem odpowiedzialnym za naprawę uszkodzeń DNA, jej niedobór powinien uwrażliwiać komórki na czynniki niszczące DNA.

► Reszty ankirynowe obecne w białku LGA odgrywają kluczową rolę w funkcjonowaniu tego białka.



Jak przedstawiono wyżej, resztom ankirynowym przypisuje się rolę w oddziaływaniach między białkami, a także między białkami i DNA. Pojawia się zatem pytanie, czy transfekcja komórek T98G sekwencją kodującą LGA, ale pozbawioną reszt ankirynowych spowoduje podobne do obserwowanych w komórkach TLGA zmiany?

► Mechanizm zmian obserwowanych w komórkach TLGA może mieć związek z poziomem ekspresji cytokin w tych komórkach.

Na podstawie danych uzyskanych dzięki analizie ekspresji genów techniką mikromacierzy DNA można wnioskować, że komórki TLGA charakteryzują się obniżonym poziomem ekspresji genu *COL1A2*, kodującego jeden z łańcuchów polipeptydowych kolagenu. Istnieją liczne doniesienia dokumentujące wpływ cytokin na poziom ekspresji *COL1A2* (Ramirez i wsp., 2006). Wykazano, że TNF- $\alpha$  (Verrecchia i wsp., 2002; Hirose i wsp., 2008), INF- $\alpha$  (Inagaki i wsp., 2003) oraz INF- $\gamma$  (Xu i wsp., 2003; 2004; 2008) hamują ekspresję *COL1A2*, natomiast TGF- $\beta$  i CTGF aktywują jego ekspresję (Chujo i wsp., 2005). Jednocześnie pojawia się coraz więcej dowodów na ważną rolę czynnika transkrypcyjnego GATA3 w regulacji transkrypcji genów kodujących niektóre cytokiny (Umetani i wsp. 2001; Blokzijl i wsp., 2002; Hoehler i wsp., 2005; Mantel i wsp., 2007). Zatem obserwowana nadekspresja *GATA3* w komórkach TLGA może pośrednio wpływać na supresję ekspresji *COL1A2* w tych komórkach.

► Transfekcja astrocytów sekwencją kodującą LGA wpłynie na ich cechy fenotypowe.

Ta hipoteza dotyka fizjologicznej roli występowania aż trzech glutaminaz w mózgu. Wydaje się, że do syntezy glutaminianu powinna wystarczyć jedna izoforma GA, zatem współistnienie kilku izoform sugeruje ich zaangażowanie w inne procesy występujące w komórce. Astrocyty, w których gen *LGA* ulega znacznie słabszej ekspresji w porównaniu do neuronów stają się naturalnym modelem do badań nad tym zagadnieniem.

## VII. Wnioski

1. Nowotwory OUN pochodzenia astrocytarnego lub ependymalnego charakteryzują się brakiem lub jedynie śladowymi ilościami transkryptu genu *LGA*, natomiast w mieszanych guzach neuronalno-glejowych gen *LGA* ulega ekspresji na znacznym poziomie. Jednocześnie w szczurzych astrocytach pochodzących z hodowli pierwotnych poziom ekspresji *LGA* jest 4-krotnie niższy w porównaniu do poziomu ekspresji tego genu w szczurzych neuronach pochodzących z hodowli pierwotnych. Zatem poziom ekspresji *LGA* w nowotworach OUN nie zależy od stopnia złośliwości guza, natomiast jest konsekwencją typu komórek tworzących nowotwór.

2. Nowotwory OUN wykazują nadekspresję transkryptu kodującego GAC, przy czym zjawisko to nie ma związku ze stopniem złośliwości guza ani typem tworzących go komórek, jest natomiast opisywane w innych typach nowotworów.

3. Stabilna transfekcja komórek linii glejaka ludzkiego T98G sekwencją kodującą *LGA* zmienia ich fenotyp na mniej złośliwy, co wyraża się w znamienne statystycznie obniżonej proliferacji i przeżywalności oraz zdolności do migracji.

4. Stabilna transfekcja komórek linii glejaka ludzkiego T98G sekwencją kodującą *LGA* prowadzi do zmian w poziomie ekspresji licznych genów, w tym kilku potencjalnie związanych z obserwowanymi w tych komórkach zmianami fenotypowymi.

5. Molekularny mechanizm obserwowanych zmian w cechach fizjologicznych komórek oraz w poziomie ekspresji genów pozostaje nieznany.



## VIII. Streszczenie

Glutamina jest najbardziej rozpowszechnionym aminokwasem w organizmie, a pełnione przez nią funkcje są bardzo liczne i różnorodne: od podstawowego źródła energii, przez substrat do syntezy nukleotydów i białek, po rolę prekursora Glu i GSH oraz azotu i szkieletów węglowych. W komórkach OUN Gln odgrywa dodatkowo niezwykle istotną rolę w neutralizacji amoniaku i syntezie neuroprzekaźników: Glu i GABA. Ponadto istnieją liczne doniesienia dokumentujące wpływ Gln na poziom ekspresji genów w różnych tkankach.

Także w komórkach różnych nowotworów aminokwas ten odgrywa szereg ważnych funkcji związanych z metabolizmem, proliferacją, adhezyjnością oraz syntezą DNA i białek. W przypadku glejaków niezwykle istotną wydaje się być rola Gln jako prekursora Glu - odpowiedzialnego za wzrost i migrację tych guzów - oraz GSH - odpowiedzialnego za oporność tych guzów na radio- i chemioterapię.

Fakty i hipotezy dotyczące roli Gln zarówno w tkankach zdrowych, jak i nowotworowych w naturalny sposób skierowały uwagę badaczy na glutaminazę katalizującą reakcję hydrolizy Gln do Glu i jonów amonowych. W komórkach ssaków zidentyfikowano dwa geny kodujące GA: gen *LGA* koduje glutaminazę typu wątrobowego, gen *KGA* - glutaminazę typu nerkowego oraz dwie inne izoformy: *GAC* i *GAM*. Poszczególne izoformy GA różnią się między sobą zarówno strukturą, parametrami kinetycznymi, jak również specyficznością tkankową. Istnieje szereg dowodów na zaburzoną ekspresję i/lub aktywność GA lub jej konkretnych izoform w różnych typach nowotworów. Przyczyny tych zaburzeń oraz ich konsekwencje dla procesu nowotworzenia pozostają nieznane. Postuluje się, że gen *KGA* ulega silnej ekspresji w komórkach intensywnie proliferujących, natomiast wzmożona ekspresja *LGA* jest charakterystyczna dla komórek zróżnicowanych, nieulegających podziałom.

Dodatkowymi elementami komplikującymi rozważania nad rolą GA w komórce są spostrzeżenia dotyczące koekspresji kilku izoform GA w jednym typie komórek - w tym komórek mózgu - oraz jądrowej lokalizacji *LGA* w neuronach. Obserwacje te pozwoliły postawić hipotezę, że GA, w szczególności *LGA*, może pełnić inną niż enzymatyczną funkcję. Na podstawie jądrowej lokalizacji tego białka w neuronach oraz cech

strukturalnych (reszty ankirynowe) i funkcjonalnych (oddziaływania z białkami posiadającymi domenę PDZ) zaproponowano rolę LGA w regulacji procesów transkrypcji.

Prezentowana praca dotyczy ekspresji genu *LGA* w guzach OUN oraz wpływu LGA na fenotyp i ekspresję genów w glejopochodnych komórkach nowotworowych.

W pierwszym etapie badań przeprowadzono analizę ekspresji mRNA kodujących LGA, KGA i GAC w glejakach o najwyższym stopniu złośliwości: *glioblastoma* (WHO IV) i *anaplastic astrocytoma* (WHO III). Analiza wykazała brak ekspresji genu *LGA* w tych guzach, co wydawało się być ciekawą obserwacją z punktu widzenia diagnostyki tych nowotworów. Do dalszych badań wykorzystano guzy pochodzenia astrocytarnego o najniższym stopniu złośliwości (WHO I): *pilocytic astrocytoma* i SEGA, guzy pochodzenia ependymalnego (WHO II-III), oligodendroglejowego (WHO II) oraz mieszane guzy neuronalno-glejowe (WHO I-III). Analiza wykazała brak lub jedynie śladowe ilości transkryptu genu *LGA* w guzach pochodzenia astrocytarnego i ependymalnego, niezależnie od ich stopnia złośliwości. Guzy neuronalno-glejowe oraz pojedynczy przypadek *oligodendroglioma* wykazywały – również niezależnie od stopnia złośliwości – znaczny poziom transkryptu *LGA*. Obserwacja ta zrodziła hipotezę, że gen *LGA* ulega silnej ekspresji w neuronach, natomiast jej poziom w astrocytach jest znikomy. Hipoteza ta znalazła potwierdzenie w dalszych badaniach: nienowotworowy materiał pochodzący od pacjentów z padaczką, zawierający dużą ilość neuronów wykazywał znaczne ilości *LGA*. Również szczurze neurony pochodzące z hodowli pierwotnych charakteryzowały się wysokim, 4-krotnie większym w porównaniu do szczurzych astrocytów, poziomem tego transkryptu. Wyciągnięto zatem wniosek, że brak lub śladowy poziom ekspresji *LGA* obserwowany w guzach pochodzenia astrocytarnego i ependymalnego jest konsekwencją niskiego poziomu tego transkryptu w komórkach gleju.

Drugim spostrzeżeniem wynikającym z analizy ekspresji GA w guzach OUN jest nadekspresja izoformy GAC w tych nowotworach. Należy jednak zaznaczyć, że istnieją dane literaturowe dokumentujące nadekspresję tej izoformy w komórkach raka piersi, zatem jej nadekspresja w guzach mózgu dobrze wpisuje się w istniejący stan wiedzy.

Obserwacje dotyczące niskiego poziomu ekspresji genu *LGA* lub wręcz braku jego transkryptu w poszczególnych typach guzów OUN zrodziły pytanie o konsekwencje tego zjawiska dla procesu nowotworzenia i/lub fizjologii komórek glejaka. W celu uzyskania

odpowiedzi na to pytanie przeprowadzono szereg eksperymentów na komórkach komercyjnie dostępnej linii *glioblastoma*, T98G. W komórkach tej linii nie stwierdzono obecności transkryptu *LGA*, co uczyniło z tej linii dobry model badawczy. Komórki T98G poddano stabilnej transfekcji sekwencją kodującą ludzką *LGA*, dzięki czemu uzyskano linię TLGA, w której gen *LGA* ulega ekspresji. Wykazano, że komórki linii TLGA charakteryzują się w stosunku do komórek kontrolnych T98G i TpcDNA (T98G transfekowane pustym wektorem) znamienne statystycznie obniżonymi parametrami związanymi z procesem nowotworzenia: indeksem proliferacji, przeżywalnością (badaną za pomocą testu MTT) oraz migracją. Ponadto zastosowanie techniki mikromacierzy DNA umożliwiło kompleksową analizę profili ekspresji genów badanych komórek, która wykazała zmiany w ekspresji 85 genów w komórkach TLGA w stosunkach do komórek kontrolnych, przy czym 50 genów ulegało nadekspresji, a 35 wykazało obniżoną ekspresję. W celu potwierdzenia wyników otrzymanych w analizie mikromacierzy DNA przeprowadzono analizę ekspresji 9 genów techniką real-time PCR. Wśród badanych genów znalazły się geny potencjalnie zaangażowane w proces nowotworzenia: *S100A16*, *CAPN2*, *FNDC3B*, *DYNC1L1*, *TIMP4*, *MGMT*, *ADM* and *TIMP1* oraz gen *VAMP8*, wykazujący bardzo dużą zmianę w poziomie ekspresji w komórkach TLGA w stosunku do komórek kontrolnych. Ekspresja 6 z 9 badanych genów wykazała tendencje zgodne z wynikami uzyskanymi w analizie mikromacierzy: *VAMP8* i *FNDC3B* ulegały nadekspresji, a *S100A16*, *CAPN2*, *TIMP4* i *MGMT* ulegały obniżonej ekspresji w komórkach TLGA. Zmiany w ekspresji co najmniej trzech genów (*S100A16*, *CAPN2*, *MGMT*) wydają się współgrać z wynikami testów fizjologicznych dotyczących proliferacji i migracji badanych komórek.

W prezentowanej pracy przedstawiono wpływ transfekcji sekwencją kodującą *LGA* na fenotyp glejopochodnych komórek nowotworowych. Wykazano znamienne statystycznie obniżenie parametrów fizjologicznych komórek, istotnych w kontekście ich nowotworowego fenotypu, a także zmiany w poziomie transkrypcji wielu genów, kodujących białka pełniące w komórce bardzo odmienne funkcje. Molekularny mechanizm obserwowanych zmian jest niejasny. Postulowana w literaturze kwestia *LGA* jako czynnika transkrypcyjnego pozostaje nadal otwarta i wydaje się być naturalnym przedmiotem kolejnych intensywnych eksperymentów, mimo że brak komercyjnie dostępnego przeciwciała anti-*LGA* znacznie utrudni dalsze badania. Także wyniki analizy profili ekspresji genów w komórkach TLGA i w komórkach kontrolnych stają się punktem

wyjścia do budowania licznych hipotez dotyczących roli LGA w kształtowaniu nowotworowego fenotypu tych komórek.

**IX. Literatura**

1. Aledo JC, Segura JA, Medina MA, Alonso FJ, Núñez de Castro I, Márquez J. (1994) Phosphate-activated glutaminase expression during tumor development. *FEBS Lett* 341:39-42
2. Aledo JC, Gómez-Fabre PM, Olalla L, Márquez J. (2000) Identification of two human glutaminase loci and tissue-specific expression of the two related genes. *Mamm Genome* 11:1107-1110.
3. Amores-Sánchez MI, Medina MA. (1999) Glutamine, as a precursor of glutathione, and oxidative stress. *Mol Genet Metab* 67:100-105
4. Babu R, Eaton S, Drake DP, Spitz L, Pierro A. (2001) Glutamine and glutathione counteract the inhibitory effects of mediators of sepsis in neonatal hepatocytes. *J Pediatr Surg* 36:282-286
5. Batchelor AH, Piper DE, de la Brousse FC, McKnight SL, Wolberger C. (1998) The structure of GABPalpha/beta: an ETS domain- ankyrin repeat heterodimer bound to DNA. *Science* 279:1037-1041
6. Biernat W. (1999) Molekularne podłoże procesu progresji złośliwości glejaków rozlanych ośrodkowego układu nerwowego. *Onkol Pol* 2:113-119
7. Biernat W, Zawrocki A. (2007) Molecular alterations in ependymomas. *Folia Neuropathol* 45:155-163
8. Blokzijl A, ten Dijke P, Ibáñez CF. (2002) Physical and functional interaction between GATA-3 and Smad3 allows TGF-beta regulation of GATA target genes. *Curr Biol* 12:35-45
9. Bode BP. (2001) Recent molecular advances in mammalian glutamine transport. *J Nutr* 131:2475S-2485S
10. Boza JJ, Moënnoz D, Bournot CE, Blum S, Zbinden I, Finot PA, Ballèvre O. (2000) Role of glutamine on the de novo purine nucleotide synthesis in Caco-2 cells. *Eur J Nutr* 39:38-46
11. Campos JA, Aledo JC, Segura JA, Alonso FJ, Gómez-Fabre PM, Núñez de Castro I, Márquez J. (2003) Expression of recombinant human L-glutaminase in

- Escherichia coli: polyclonal antibodies production and immunological analysis of mouse tissues. *Biochim Biophys Acta* 1648:17-23
12. Carmichael J, Chatellier J, Woolfson A, Milstein C, Fersht AR, Rubinsztein DC. (2000) Bacterial and yeast chaperones reduce both aggregate formation and cell death in mammalian cell models of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9701-9705
  13. Carrascosa JM, Martínez P, Núñez de Castro I. (1984) Nitrogen movement between host and tumor in mice inoculated with Ehrlich ascitic tumor cells. *Cancer Res* 44:3831-3835
  14. Castellani P, Borsi L, Carnemolla B, Birò A, Dorcaratto A, Viale GL, Neri D, Zardi L. (2002) Differentiation between high- and low-grade astrocytoma using a human recombinant antibody to the extra domain-B of fibronectin. *Am J Pathol* 161:1695-1700
  15. Chang WK, Yang KD, Shaio MF. (1999) Lymphocyte proliferation modulated by glutamine: involved in the endogenous redox reaction. *Clin Exp Immunol* 117:482-488
  16. Chang WK, Yang KD, Chuang H, Jan JT, Shaio MF. (2002) Glutamine protects activated human T cells from apoptosis by up-regulating glutathione and Bcl-2 levels. *Clin Immunol* 104:151-160
  17. Chow A, Zhang R. (1998) Glutamine reduces heat shock-induced cell death in rat intestinal epithelial cells. *J Nutr* 128:1296-1301
  18. Chujo S, Shirasaki F, Kawara S, Inagaki Y, Kinbara T, Inaoki M, Takigawa M, Takehara K. (2005) Connective tissue growth factor causes persistent proalpha2(I) collagen gene expression induced by transforming growth factor-beta in a mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 203:447-456
  19. Chung-Bok MI, Vincent N, Jhala U, Watford M. (1997) Rat hepatic glutaminase: identification of the full coding sequence and characterization of a functional promoter. *Biochem J* 324:193-200
  20. Collins CL, Wasa M, Souba WW, Abcouwer SF. (1998) Determinants of glutamine dependence and utilization by normal and tumor-derived breast cell lines. *J Cell Physiol* 176:166-178



21. Curi R, Newsholme P, Pithon-Curi TC, Pires-de-Melo M, Garcia C, Homem-de-Bittencourt Júnior PI, Guimarães AR. (1999) Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. *Braz J Med Biol Res* 32:15-21
22. Curthoys NP, Watford M. (1995) Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu Rev Nutr* 15:133-159
23. Demarchi F, Bertoli C, Copetti T, Eskelinen EL, Schneider C. (2007) Calpain as a novel regulator of autophagosome formation. *Autophagy* 3:235-237
24. Demarchi F, Schneider C. (2007) The calpain system as a modulator of stress/damage response. *Cell Cycle* 6:136-138
25. Dolińska M, Dybel A, Zabłocka B, Albrecht J. (2003) Glutamine transport in C6 glioma cells shows ASCT2 system characteristics. *Neurochem Int* 43:501-507
26. Dranoff G, Elion GB, Friedman HS, Campbell GL, Bigner DD. (1985) Influence of glutamine on the growth of human glioma and medulloblastoma in culture. *Cancer Res* 45:4077-4081
27. Elgadi KM, Meguid RA, Qian M, Souba WW, Abcouwer SF. (1999) Cloning and analysis of unique human glutaminase isoforms generated by tissue-specific alternative splicing. *Physiol Genomics* 1:51-62.
28. Ernest NJ, Sontheimer H. (2007) Extracellular glutamine is a critical modulator for regulatory volume increase in human glioma cells. *Brain Res* 1144:231-238
29. Giese A. (2003) Glioma invasion--pattern of dissemination by mechanisms of invasion and surgical intervention, pattern of gene expression and its regulatory control by tumor suppressor p53 and proto-oncogene ETS-1. *Acta Neurochir Suppl* 88:153-162
30. Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M. (2003) Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol* 21:1624-1636
31. Gómez-Fabre PM, Aledo JC, Del Castillo-Olivares A, Alonso FJ, Núñez De Castro I, Campos JA, Márquez J. (2000) Molecular cloning, sequencing and expression studies of the human breast cancer cell glutaminase. *Biochem J* 345:365-375
32. Grant R, Ironside JW. (1995) Glutathione S-transferases and cytochrome P450 detoxifying enzyme distribution in human cerebral glioma. *J Neurooncol* 25:1-7

33. Gresner SM, Liberski PP. (2007) Significance and prospects of study on molecular alterations in oligodendrogliomas. *Neurol Neurochir Pol* 41:333-339
34. Harris BZ, Lim WA. (2001) Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci* 114:3219-3231
35. Hau P, Stupp R, Hegi ME. (2007) MGMT methylation status: the advent of stratified therapy in glioblastoma? *Dis Markers* 23:97-104
36. Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG. (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387:733-736
37. Hertz L, Juurlink BHJ, Hertz E, Fosmark H, Schousboe AS (1989) Preparation of primary cultures of mouse (rat) astrocytes. In: Shahar A, DeVellis J, Vernadakis A, Haber B. (Eds.) *A Dissection and Tissue Culture Manual for the Nervous System*, Alan R. Liss, New York:105-108
38. Hirose Y, Aldape K, Bollen A, James CD, Brat D, Lamborn K, Berger M, Feuerstein BG. (2001) Chromosomal abnormalities subdivide ependymal tumors into clinically relevant groups. *Am J Pathol* 158:1137-1143
39. Hirose T, Nakazato K, Song H, Ishii N. (2008) TGF-beta1 and TNF-alpha are involved in the transcription of type I collagen alpha2 gene in soleus muscle atrophied by mechanical unloading. *J Appl Physiol* 104:170-177
40. Hogan A, Shepherd L, Chabot J, Quenneville S, Prescott SM, Topham MK, Gee SH. (2001) Interaction of gamma 1-syntrophin with diacylglycerol kinase-zeta. Regulation of nuclear localization by PDZ interactions. *J Biol Chem* 276:26526-26533
41. Hogstad S, Svenneby G, Torgner IA, Kvamme E, Hertz L, Schousboe A. (1988) Glutaminase in neurons and astrocytes cultured from mouse brain: kinetic properties and effects of phosphate, glutamate, and ammonia. *Neurochem Res* 13:383-388
42. Holcomb T, Taylor L, Trohkimoinen J, Curthoys NP. (2000) Isolation, characterization and expression of a human brain mitochondrial glutaminase cDNA. *Brain Res Mol Brain Res* 76:56-63
43. Holland EC. (2000) Glioblastoma multiforme: the terminator. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6242-6244

44. Höhler T, Reuss E, Adams P, Bartsch B, Weigmann B, Wörns M, Galle PR, Victor A, Neurath MF (2005) A genetic basis for IFN-gamma production and T-bet expression in humans. *J Immunol* 75:5457-5462
45. Hsueh YP, Wang TF, Yang FC, Sheng M. (2000) Nuclear translocation and transcription regulation by the membrane-associated guanylate kinase CASK/LIN-2. *Nature* 404:298-302
46. Husson A, Quillard M, Fairand A, Chedeville A, Lavoinne A. (1996) Hypoosmolarity and glutamine increased the beta-actin gene transcription in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett* 394:353-355
47. Idbaih A, Omuro A, Ducray F, Hoang-Xuan K. (2007) Molecular genetic markers as predictors of response to chemotherapy in gliomas. *Curr Opin Oncol* 19:606-611
48. Inagaki Y, Nemoto T, Kushida M, Sheng Y, Higashi K, Ikeda K, Kawada N, Shirasaki F, Takehara K, Sugiyama K, Fujii M, Yamauchi H, Nakao A, de Crombrughe B, Watanabe T, Okazaki I. (2003) Interferon alfa down-regulates collagen gene transcription and suppresses experimental hepatic fibrosis in mice. *Hepatology* 38:890-899
49. Ishiuchi S, Tsuzuki K, Yoshida Y, Yamada N, Hagimura N, Okado H, Miwa A, Kurihara H, Nakazato Y, Tamura M, Sasaki T, Ozawa S. (2002) Blockage of Ca(2+)-permeable AMPA receptors suppresses migration and induces apoptosis in human glioblastoma cells. *Nat Med* 8:971-978
50. Jemth P, Gianni S. (2007) PDZ domains: folding and binding. *Biochemistry* 46:8701-8708
51. Klingman JP, Handler D. (1958) Partial purification and properties of renal glutaminase. *J Biol Chem* 232:369-380
52. Kovacevic Z, McGivan JD. (1983) Mitochondrial metabolism of glutamine and glutamate and its physiological significance. *Physiol Rev* 63:547-605
53. Kovacevic Z. (1974) Properties and intracellular localization of Ehrlich ascites tumor cell glutaminase. *Cancer Res* 34:3403-3407
54. Krebs HA (1935) Metabolism of amino-acids: The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. *Biochem J* 29:1951-1969

55. Krex D, Klink B, Hartmann C, von Deimling A, Pietsch T, Simon M, Sabel M, Steinbach JP, Heese O, Reifenberger G, Weller M, Schackert G; German Glioma Network. (2007) Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain* 130:2596-2606
56. Kvamme E, Torgner IA, Roberg B. (2001) Kinetics and localization of brain phosphate activated glutaminase. *J Neurosci Res* 66:951-958
57. Laake JH, Slyngstad TA, Haug FM, Ottersen OP. (1995) Glutamine from glial cells is essential for the maintenance of the nerve terminal pool of glutamate: immunogold evidence from hippocampal slice cultures. *J Neurochem* 65:871-881
58. Laake JH, Takumi Y, Eidet J, Torgner IA, Roberg B, Kvamme E, Ottersen OP. (1999) Postembedding immunogold labelling reveals subcellular localization and pathway-specific enrichment of phosphate activated glutaminase in rat cerebellum. *Neuroscience* 88:1137-1151
59. Lippert U, Ferrari DM, Jahn R. (2007) Endobrevin/VAMP8 mediates exocytotic release of hexosaminidase from rat basophilic leukaemia cells. *FEBS Lett* 581:3479-3484
60. Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408
61. Lobo C, Ruiz-Bellido MA, Aledo JC, Márquez J, Núñez De Castro I, Alonso FJ. (2000) Inhibition of glutaminase expression by antisense mRNA decreases growth and tumorigenicity of tumour cells. *Biochem J* 348:257-261
62. Lora J, Alonso FJ, Segura JA, Lobo C, Márquez J, Matés JM. (2004) Antisense glutaminase inhibition decreases glutathione antioxidant capacity and increases apoptosis in Ehrlich ascitic tumour cells. *Eur J Biochem* 271:4298-4306
63. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114:97-109
64. Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, DePinho RA. (2001) Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev* 15:1311-1333
65. Mantel PY, Kuipers H, Boyman O, Rhyner C, Ouaked N, Rückert B, Karagiannidis C, Lambrecht BN, Hendriks RW, Cramer R, Akdis CA, Blaser K, Schmidt-Weber

- CB. (2007) GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. *PLoS Biol* 5:e329
66. Marenholz I, Heizmann CW. (2004) S100A16, a ubiquitously expressed EF-hand protein which is up-regulated in tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 313:237-244
67. Márquez J, Núñez de Castro I. (1991) Mouse liver free amino acids during the development of Ehrlich ascites tumour. *Cancer Lett* 58:221-224
68. Márquez J, de la Oliva AR, Matés JM, Segura JA, Alonso FJ. (2006) Glutaminase: a multifaceted protein not only involved in generating glutamate. *Neurochem Int* 48:465-471
69. Martin M, Beauvoit B, Voisin PJ, Canioni P, Guérin B, Rigoulet M. (1998) Energetic and morphological plasticity of C6 glioma cells grown on 3-D support; effect of transient glutamine deprivation. *J Bioenerg Biomembr* 30:565-578
70. Martín-Rufián M, Segura JA, Lobo C, Matés JM, Márquez J, Alonso FJ. (2006) Identification of genes downregulated in tumor cells expressing antisense glutaminase mRNA by differential display. *Cancer Biol Ther* 5:54-58
71. Matsuno T, Goto I. (1992) Glutaminase and glutamine synthetase activities in human cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 52:1192-1194
72. Matsuno T, Hirai H. (1989) Glutamine synthetase and glutaminase activities in various hepatoma cells. *Biochem Int* 19:219-225
73. Medina MA, Sanchez-Jimenez F, Quesada AR, Marquez J, Nunez de Castro I. (1992) Relevance of glutamine metabolism to tumor cell growth. *Mol Cell Biochem* 113: 1-15.
74. Meertens LM, Miyata KS, Cechetto JD, Rachubinski RA, Capone JP. (1998) A mitochondrial ketogenic enzyme regulates its gene expression by association with the nuclear hormone receptor PPARalpha. *EMBO J* 17:6972-6978
75. Merlo A. (2003) Genes and pathways driving glioblastomas in humans and murine disease models. *Neurosurg Rev* 26:145-158
76. Mosavi LK, Cammett TJ, Desrosiers DC, Peng ZY. (2004) The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci* 13:1435-1448

77. Nagamatsu S, Nakamichi Y, Watanabe T, Matsushima S, Yamaguchi S, Ni J, Itagaki E, Ishida H. (2001) Localization of cellubrevin-related peptide, endobrevin, in the early endosome in pancreatic beta cells and its physiological function in exocytosis of secretory granules. *J Cell Sci* 114:219-227
78. Nagane M, Kobayashi K, Ohnishi A, Shimizu S, Shiokawa Y. (2007) Prognostic significance of O6-methylguanine-DNA methyltransferase protein expression in patients with recurrent glioblastoma treated with temozolomide. *Jpn J Clin Oncol* 37:897-906
79. Newsholme P, Curi R, Pithon Curi TC, Murphy CJ, Garcia C, Pires de Melo M. (1999) Glutamine metabolism by lymphocytes, macrophages, and neutrophils: its importance in health and disease. *J Nutr Biochem* 10:316-324
80. Newsholme P, Lima MM, Procopio J, Pithon-Curi TC, Doi SQ, Bazotte RB, Curi R (2003) Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Braz J Med Biol Res* 36:153-163
81. Norenberg MD. (1979) Distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. *Histochem Cytochem* 27:756-762
82. Norenberg MD, Martinez – Hernandez A. (1979) Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res* 161:303-310
83. Ohgaki H. (2005) Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology* 25:1-7
84. Ohgaki H, Kleihues P. (2005) Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 109:93-108
85. Ohgaki H, Kleihues P. (2005) Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neuro* 64:479-489
86. Ohgaki H, Kleihues P. (2007) Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 170:1445-1453
87. Okamoto Y, Di Patre PL, Burkhard C, Horstmann S, Jourde B, Fahey M, Schüler D, Probst-Hensch NM, Yasargil MG, Yonekawa Y, Lütolf UM, Kleihues P, Ohgaki H. (2004) Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol* 108:49-56

88. Olalla L, Aledo JC, Bannenberg G, Márquez J. (2001) The C-terminus of human glutaminase L mediates association with PDZ domain-containing proteins. *FEBS Lett* 488:116-122
89. Olalla L, Gutiérrez A, Campos JA, Khan ZU, Alonso FJ, Segura JA, Márquez J, Aledo JC. (2002) Nuclear localization of L-type glutaminase in mammalian brain. *J Biol Chem* 277:38939-38944
90. Palacin M, Esevez R, Bertran J, Zorzano A. (1998) Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol Rev* 78: 969-1054
91. Pawlik TM, Souba W, Sweeney TJ, Bode BP. (2000) Amino acid uptake and regulation in multicellular hepatoma spheroids. *J Surg Res* 91:15-25
92. Perera SY, Chen TC, Curthoys NP. (1990) Biosynthesis and processing of renal mitochondrial glutaminase in cultured proximal tubular epithelial cells and in isolated mitochondria. *J Biol Chem* 265:17764-17770
93. Perera SY, Voith DM, Curthoys NP. (1991) Biosynthesis and processing of mitochondrial glutaminase in HTC hepatoma cells. *Biochem J* 273:265-270
94. Pérez-Gómez C, Matés JM, Gómez-Fabre PM, del Castillo-Olivares A, Alonso FJ, Márquez J. (2003) Genomic organization and transcriptional analysis of the human l-glutaminase gene. *Biochem J* 370:771-784
95. Pérez-Gómez C, Campos-Sandoval JA, Alonso FJ, Segura JA, Manzanares E, Ruiz-Sánchez P, González ME, Márquez J, Matés JM. (2005) Co-expression of glutaminase K and L isoenzymes in human tumour cells. *Biochem J* 386:535-542
96. Pithon-Curi TC, Levada AC, Lopes LR, Doi SQ, Curi R. (2002) Glutamine plays a role in superoxide production and the expression of p47phox, p22phox and gp91phox in rat neutrophils. *Clin Sci* 103:403-408
97. Pithon-Curi TC, Schumacher RI, Freitas JJ, Lagranha C, Newsholme P, Palanch AC, Doi SQ, Curi R. (2003) Glutamine delays spontaneous apoptosis in neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C1355-C1361
98. Portais J, Martin M, Canioni P, Merle M. (1999) Glutathione, but not glutamine, is detected in <sup>13</sup>C-NMR spectra of perchloric acid extracts from C6 glioma cells. *FEBS Letters* 327:301-306

99. Porter LD, Ibrahim H, Taylor L, Curthoys NP.(2002) Complexity and species variation of the kidney-type glutaminase gene. *Physiol Genomics* 9:157-166
100. Quillard M, Husson A, Lavoinne A. (1996) Glutamine increases argininosuccinate synthetase mRNA levels in rat hepatocytes. The involvement of cell swelling. *Eur J Biochem* 236:56-59
101. Ramirez F, Tanaka S, Bou-Gharios G. (2006) Transcriptional regulation of the human alpha2(I) collagen gene (COL1A2), an informative model system to study fibrotic diseases. *Matrix Biol* 25:365-372
102. Reichrath J, Welter C, Mitschele T, Classen U, Meineke V, Tilgen W, Seifert M. (2003) Different expression patterns of calpain isozymes 1 and 2 (CAPN1 and 2) in squamous cell carcinomas (SCC) and basal cell carcinomas (BCC) of human skin. *J Pathol* 199:509-516
103. Rhoads JM, Argenzio RA, Chen W, Rippe RA, Westwick JK, Cox AD, Berschneider HM, Brenner DA. (1997) L-glutamine stimulates intestinal cell proliferation and activates mitogen-activated protein kinases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 272: G943-G953
104. Rzeski W, Turski L, Ikonomidou C. (2001) Glutamate antagonists limit tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6372-6377
105. Santoso JT, Lucci JA 3rd, Coleman RL, Hatch S, Wong P, Miller D, Mathis JM. (1998) Does glutamine supplementation increase radioresistance in squamous cell carcinoma of the cervix? *Gynecol Oncol* 71:359-363
106. Satyal SH, Schmidt E, Kitagawa K, Sondheimer N, Lindquist S, Kramer JM, Morimoto RI. (2000) Polyglutamine aggregates alter protein folding homeostasis in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5750-5755
107. Schousboe A, Meier E, Drejer J, Hertz L (1989) Preparation of primary cultures of mouse (rat) cerebellar granule cells. In: Shahr A, DeVellis J, Vernadakis A, Haber B. (Eds.) *A Dissection and Tissue Culture Manual for the Nervous System*, Alan R. Liss, New York: 203-206
108. Segura JA, Ruiz-Bellido MA, Arenas M, Lobo C, Márquez J, Alonso FJ. (2001) Ehrlich ascites tumor cells expressing anti-sense glutaminase mRNA lose their capacity to evade the mouse immune system. *Int J Cancer* 91:379-384



109. Segura JA, Donadio AC, Lobo C, Matés JM, Márquez J, Alonso FJ. (2005) Inhibition of glutaminase expression increases Sp1 phosphorylation and Sp1/Sp3 transcriptional activity in Ehrlich tumor cells. *Cancer Lett* 218:91-98
110. Shapiro RA, Haser WG, Curthoys NP. (1987) Immunoblot analysis of glutaminase peptides in intact and solubilized mitochondria isolated from various rat tissues. *Biochem J* 242:743-747
111. Shapiro RA, Farrell L, Srinivasan M, Curthoys NP. (1991) Isolation, characterization, and in vitro expression of a cDNA that encodes the kidney isoenzyme of the mitochondrial glutaminase. *J Biol Chem* 266:18792-18796
112. Sidoryk M, Matyja E, Dybel A, Zielinska M, Bogucki J, Jaskólski DJ, Liberski PP, Kowalczyk P, Albrecht J. (2004) Increased expression of a glutamine transporter SNAT3 is a marker of malignant gliomas. *Neuroreport* 15:575-578
113. Smirnov DA, Zweitzig DR, Foulk BW, Miller MC, Doyle GV, Pienta KJ, Meropol NJ, Weiner LM, Cohen SJ, Moreno JG, Connelly MC, Terstappen LW, O'Hara SM. (2005) Global gene expression profiling of circulating tumor cells. *Cancer Res.* 65:4993-4997
114. Sonnewald U, Westergaard N, Schousboe A, Svendes JS, Unsgard G, Petersen SB. (1993) Direct demonstration by [<sup>13</sup>C]NMR spectroscopy that glutamine from astrocytes is a precursor for GABA synthesis in neurons. *Neurochem Int* 22:19-29
115. Souba WW. (1993) Glutamine and cancer. *Ann Surg* 218: 715-728
116. Spittler A, Oehler R, Goetzinger P, Holzer S, Reissner CM, Leutmezer F, Rath V, Wrba F, Fuegger R, Boltz-Nitulescu G, Roth E. (1997) Low glutamine concentrations induce phenotypical and functional differentiation of U937 myelomonocytic cells. *J Nutr* 127:2151-2157
117. Stupp R, Hegi ME, Gilbert MR, Chakravarti A. (2007) Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. *J Clin Oncol* 25:4127-4136
118. Sturchler E, Cox JA, Durussel I, Weibel M, Heizmann CW. (2006) S100A16, a novel calcium-binding protein of the EF-hand superfamily. *J Biol Chem* 281:38905-38917
119. Takano T, Lin JH, Arcuino G, Gao Q, Yang J, Nedergaard M. (2001) Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nat Med* 7:1010-1015

120. Tubbs JL, Pegg AE, Tainer JA. (2007) DNA binding, nucleotide flipping, and the helix-turn-helix motif in base repair by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and its implications for cancer chemotherapy. *DNA Repair* 6:1100-1115
121. Turner A, McGivan JD. (2003) Glutaminase isoform expression in cell lines derived from human colorectal adenomas and carcinomas. *Biochem J* 370:403-408
122. Turowski GA, Rashid Z, Hong F, Madri JA, Basson MD. (1994) Glutamine modulates phenotype and stimulates proliferation in human colon cancer cell lines. *Cancer Res* 54:5974-5980
123. Umetani M, Mataka C, Minegishi N, Yamamoto M, Hamakubo T, Kodama T. (2001) Function of GATA transcription factors in induction of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 by tumor necrosis factor-alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:917-922
124. van den Boom J, Wolter M, Kuick R, Misek DE, Youkilis AS, Wechsler DS, Sommer C, Reifemberger G, Hanash SM. (2003) Characterization of gene expression profiles associated with glioma progression using oligonucleotide-based microarray analysis and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Am J Pathol*. 163:1033-1043
125. Verbeek B, Southgate TD, Gilham DE, Margison GP. (2008) O6-Methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy. *Br Med Bull* 85:17-33
126. Verrecchia F, Wagner EF, Mauviel A. (2002) Distinct involvement of the Jun-N-terminal kinase and NF-kappaB pathways in the repression of the human COL1A2 gene by TNF-alpha. *EMBO Rep* 3:1069-1074
127. Wang M, Liu YE, Greene J, Sheng S, Fuchs A, Rosen EM, Shi YE. (1997) Inhibition of tumor growth and metastasis of human breast cancer cells transfected with tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *Oncogene* 14:2767-2774
128. Wang CC, Ng CP, Lu L, Atlashkin V, Zhang W, Seet LF, Hong W. (2004) A role of VAMP8/endobrevin in regulated exocytosis of pancreatic acinar cells. *Dev Cell* 7:359-371
129. Wang CC, Shi H, Guo K, Ng CP, Li J, Gan BQ, Chien Liew H, Leinonen J, Rajaniemi H, Zhou ZH, Zeng Q, Hong W. (2007) VAMP8/endobrevin as a general vesicular SNARE for regulated exocytosis of the exocrine system. *Mol Biol Cell* 18:1056-1063

130. Wasa M, Bode BP, Abcouwer SF, Collins CL, Tanabe KK, Souba WW. (1996) Glutamine as a regulator of DNA and protein biosynthesis in human solid tumor cell lines. *Ann Surg* 224:189-197
131. Wischmeyer PE, Kahana M, Wolfson R, Ren H, Musch MM, Chang EB. (2001) Glutamine induces heat shock protein and protects against endotoxin shock in the rat. *J Appl Physiol* 90:2403-2410
132. Wischmeyer PE, Riehm J, Singleton KD, Ren H, Musch MW, Kahana M, Chang EB. (2003) Glutamine attenuates tumor necrosis factor-alpha release and enhances heat shock protein 72 in human peripheral blood mononuclear cells. *Nutrition* 19:1-6
133. Witte D, Ali N, Carlson N, Younes M. (2002) Overexpression of the neutral amino acid transporter ASCT2 in human colorectal adenocarcinoma. *Anticancer Res* 22:2555-2557
134. Xia Y, Wen HY, Young ME, Guthrie PH, Taegtmeyer H, Kellems RE. (2003) Mammalian target of rapamycin and protein kinase A signaling mediate the cardiac transcriptional response to glutamine. *J Biol Chem* 278:13143-13150
135. Xiang J, Ennis SR, Abdelkarim GE, Fujisawa M, Kawai N, Keep RF. (2003) Glutamine transport at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Neurochem Int* 43:279-288
136. Xu Y, Harton JA, Smith BD. (2008) CIITA mediates interferon-gamma repression of collagen transcription through phosphorylation-dependent interactions with co-repressor molecules. *J Biol Chem* 283:1243-1256
137. Xu Y, Nguyen Q, Lo DC, Czaja MJ. (1997) c-myc-Dependent hepatoma cell apoptosis results from oxidative stress and not a deficiency of growth factors. *J Cell Physiol* 170:192-199
138. Xu Y, Wang L, Buttice G, Sengupta PK, Smith BD. (2003) Interferon gamma repression of collagen (COL1A2) transcription is mediated by the RFX5 complex. *J Biol Chem* 278:49134-49144
139. Xu Y, Wang L, Buttice G, Sengupta PK, Smith BD. (2004) Major histocompatibility class II transactivator (CIITA) mediates repression of collagen (COL1A2) transcription by interferon gamma (IFN-gamma). *J Biol Chem* 279:41319-41332

140. Yang N, Higuchi O, Mizuno K. (1998) Cytoplasmic localization of LIM-kinase 1 is directed by a short sequence within the PDZ domain. *Exp Cell Res* 241:242-252
141. Yang N, Mizuno K. (1999) Nuclear export of LIM-kinase 1, mediated by two leucine-rich nuclear-export signals within the PDZ domain. *Biochem J* 338:793-798
142. Ye ZC, Sontheimer H. (1999) Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. *Cancer Res* 59:4383-4391
143. Ye ZC, Rothstein JD, Sontheimer H. (1999) Compromised glutamate transport in human glioma cells: reduction-mislocalization of sodium-dependent glutamate transporters and enhanced activity of cystine-glutamate exchange. *J Neurosci* 19, 10767-10777.
144. Zhang A, Li CW, Chen JD. (2007) Characterization of transcriptional regulatory domains of ankyrin repeat cofactor-1. *Biochem Biophys Res Commun* 358:1034-1040
145. Zhang A, Yeung PL, Li CW, Tsai SC, Dinh GK, Wu X, Li H, Chen JD. (2004) Identification of a novel family of ankyrin repeats containing cofactors for p160 nuclear receptor coactivators. *J Biol Chem* 279:33799-33805
146. Zimmermann P. (2006) The prevalence and significance of PDZ domain-phosphoinositide interactions. *Biochim Biophys Acta* 1761:947-956

