

mgr inż. Ewelina Julia Majewska

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

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

Promotor: dr hab. Monika Paulina Szeliga



 Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

KNO

Krajowy Naukowy
Ośrodek Wiodący
2012-2017

 **NARODOWE
CENTRUM
NAUKI**

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

WARSZAWA 2018

STRESZCZENIE

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

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

W tkankach GBM obserwuje się silną ekspresję genu *GLS*, przy braku lub śladowej ekspresji genu *GLS2*, czego przyczyną jest hipermetylacja DNA w obrębie *GLS2*. Transfekcja komórek GBM linii T98G sekwencją kodującą GAB obniża przeżywalność i indeks proliferacji oraz zdolności migracyjne tych komórek. Molekularne mechanizmy leżące u podstaw obserwowanych zmian we własnościach biologicznych komórek transfekowanych sekwencją GAB pozostają nieznane. Stwierdzenie obecności GAB nie tylko w mitochondriach, ale i jądrach komórkowych neuronów i astrocytów oraz wykazanie oddziaływań GAB z białkami zawierającymi domenę PDZ dało podstawy do stworzenia hipotezy, że poza rolą enzymatyczną GAB może być zaangażowana bezpośrednio lub pośrednio w regulację transkrypcji genów. Transfekcja sekwencją GAB komórek T98G zmienia ekspresję licznych genów, w tym *GATA3*, którego ekspresja wzrosła w wyniku transfekcji. *GATA3* jest czynnikiem transkrypcyjnym zaangażowanym w regulację takich procesów jak hematopoeza, rozwój gruczołów mlekowych, skóry czy systemu nerwowego. Białko to wykazuje działanie plejotropowe w kształtowaniu

fenotypu różnych nowotworów: w przypadku neuroblastoma niski poziom GATA3 związany jest z pozytywnym rokowaniem dla pacjentów, a w raku piersi czy pęcherza moczowego spadek poziomu GATA3 koreluje ze wzrostem agresywności nowotworu. Ponadto, GATA3 wpływa na poziom cytokin, których rozregulowany poziom stwierdzono w GBM, np. IL-10, IL-6, STAT3. Poziom ekspresji ani rola białka GATA3 w GBM nie była do tej pory zbadana.

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

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

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

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

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

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

Dotychczasowe badania wykazały, że komórki T98G po transfekcji GAB stają się bardziej wrażliwe na działanie czynników stresu oksydacyjnego, w tym H₂O₂. W niniejszej pracy wykazano, że komórki wszystkich badanych linii GBM po transfekcji sekwencją GAB stają się bardziej wrażliwe na działanie H₂O₂. W celu wyjaśnienia mechanizmu obserwowanego zjawiska ponownie poddano analizie szlak AKT, jednakże tym razem w warunkach działania na komórki H₂O₂, który indukuje fosforylację białka AKT. Zgodnie z hipotezą, że transfekcja sekwencją kodującą GAB uwrażliwia komórki na działanie H₂O₂ poprzez modulowanie szlaku AKT, zaobserwowano obniżenie poziomu fosforylacji AKT na Thr308, a także pPDK1 i pPI3K

w komórkach linii GBM po transfekcji. W komórkach TGAB i UGAB zaobserwowano także obniżenie poziomu fosforylacji AKT na Ser473. Wyniki te wskazują na zmniejszoną aktywację szlaku AKT przez egzogenną GAB. W komórkach LNGAB stwierdzono zwiększoną fosforylację AKT na Ser473, jednakże przyczyny tej różnicy pozostają nieznane. Obniżenie poziomu białka całkowitego, ale nie transkryptu *AKT*, które obserwowano tylko w komórkach UGAB w porównaniu z komórkami UpcDNA sugeruje, że aktywność AKT w komórkach T98G i LN229 jest modulowana na poziomie potranslacyjnym, podczas gdy w komórkach U87MG na poziomie zarówno translacyjnym, jak i potranslacyjnym. Podobnie za obniżenie poziomu białka całkowitego PDK1 w komórkach U87MG i LN229 oraz PI3K w komórkach U87MG mogą odpowiadać mechanizmy translacyjne jak i potranslacyjne.

Niezależnie od zaobserwowanych różnic między badanymi liniami komórkowymi GBM stwierdzono, że transfekcja sekwencją GAB prowadzi do obniżonego poziomu fosforylacji AKT w komórkach wszystkich badanych linii komórkowych w porównaniu z komórkami kontrolnymi pcDNA w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego przez H₂O₂. Wywołane przez egzogenną GAB obniżenie aktywności szlaku AKT przyczynia się do zwiększania wrażliwości badanych linii GBM na H₂O₂. Wniosek ten został sformułowany na podstawie obserwacji, że preinkubacja komórek z PDGF-BB, aktywatorem fosforylacji AKT, chroni komórki transfekowane GAB przed śmiercią spowodowaną działaniem H₂O₂.

Poziom fosforylacji AKT może wpływać na aktywność czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. W niniejszej rozprawie wykazano, że komórki TGAB i UGAB pod wpływem działania H₂O₂ wykazują znaczącą redukcję fosforylacji NF- κ B na Ser536 oraz zwiększoną aktywność kaspaz 3/7 w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Wyniki te sugerują, że egzogenna GAB w komórkach T98G i U87MG poddanych działaniu H₂O₂ promuje apoptozę tych komórek poprzez obniżenie aktywności NF- κ B. Należy zauważyć, że traktowanie komórek LNGAB za pomocą H₂O₂ skutkowało tendencją do zwiększania poziomu fosforylowanego NF- κ B, przy czym nie zmieniało aktywności kaspaz 3/7, co sugeruje że komórki tej linii GBM ulegają śmierci w wyniku innego mechanizmu niż apoptoza zależna od kaspaz.