

Autoreferat

dr n. med. Monika Szeliga

Adiunkt

Zakład Neurotoksykologii

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN

Warszawa, 2016

**1. Imię i Nazwisko.**

Monika Szeliga

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**

**2008:** stopień doktora nauk medycznych; specjalność: biologia molekularna; Zakład Neurotoksykologii, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie

Tytuł rozprawy: „Glutaminazy w glejopochodnych komórkach nowotworowych”;  
promotor: prof. dr hab. Jan Albrecht

**2001:** tytuł magistra biologii; specjalność: biologia molekularna;

Zakład Genetyki, Wydział Biologii; Uniwersytet Warszawski

Tytuł rozprawy: „Strukturalna i funkcjonalna analiza 5'UTR genu arginazy w *Aspergillus nidulans*”; promotor: prof. dr hab. Piotr Węgleński

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych.**

**od 2010:** adiunkt, Zakład Neurotoksykologii, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie

**2008-2010:** asystent, Zakład Neurotoksykologii, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie

**2004-2008:** doktorantka, Zakład Neurotoksykologii, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie

**2001-2008:** młodszy asystent, Pracownia Onkologii Molekularnej, Zakład Patomorfologii, Instytut Matki i Dziecka w Warszawie

4. **Wskazanie osiągnięcia\* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):**

\* w przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/ prace wspólne, należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

**Izoformy glutaminaz w komórkach glioblastoma i guzach neuroendokrynych.**

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa),

1. **Szeliga M**, Bogacińska-Karaś M, Kuźmich K, Rola R, Albrecht J. Downregulation of GLS2 in glioblastoma cells is related to DNA hypermethylation but not to the p53 status. *Mol Carcinog.* 2015 Aug 10. doi: 10.1002/mc.22372. **autor korespondujący**; IF 2015: 4.722; MNISW: 35.
2. **Szeliga M**, Zgrzywa A, Obara-Michlewska M, Albrecht J. Transfection of a human glioblastoma cell line with liver-type glutaminase (LGA) down-regulates the expression of DNA-repair gene MGMT and sensitizes the cells to alkylating agents. *J Neurochem.* 2012 Nov;123(3):428-436. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07917.x. **autor korespondujący**; IF 2012: 3.973; MNISW: 35.
3. **Szeliga M**, Bogacińska-Karaś M, Różycka A, Hilgier W, Marquez J, Albrecht J. Silencing of GLS and overexpression of GLS2 genes cooperate in decreasing the proliferation and viability of glioblastoma cells. *Tumour Biol.* 2014 Mar;35(3):1855-1862. doi: 10.1007/s13277-013-1247-4. **autor korespondujący**; IF 2014: 3.611; MNISW: 25.
4. **Szeliga M**, Ćwikła J, Obara-Michlewska M, Cichocki A, Albrecht J. Glutaminases in slowly proliferating gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms/tumors (GEP-NETs): Selective overexpression of mRNA coding for the KGA isoform. *Exp Mol Pathol.* 2016 Feb;100(1):74-78. doi: 10.1016/j.yexmp.2015.11.017. **autor korespondujący**; IF 2015: 2.638; MNISW: 30.

**Sumaryczny IF wyżej wymienionych prac: 14.944; MNiSW: 125 pkt.**

\* Opis indywidualnego wkładu habilitantki w powstanie każdej z wieloautorskich publikacji znajduje się w Załączniku 4. Oświadczenia wszystkich współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w Załączniku 6.

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

### **Wstęp**

Pomimo postępu medycyny glejaki, najczęstsze pierwotne nowotwory ośrodkowego układu nerwowego (OUN) stanowią ogromne wyzwanie terapeutyczne. Glejak wielopostaciowy (glioblastoma, GBM, WHO IV) jest najczęstszym pierwotnym nowotworem ośrodkowego układu nerwowego u dorosłych, charakteryzującym się agresywnym przebiegiem klinicznym i złymi rokowaniami. Roczna zapadalność na GBM wynosi 3-5/100 000. U ok. 90% pacjentów z GBM dochodzi do wznowy nowotworu, mediana całkowitego czasu przeżycia wynosi 15-18 miesięcy, a pięcioletni okres przeżycia dotyczy mniej niż 10% pacjentów [Weller i wsp., 2013]. Głównymi przyczynami niepowodzeń terapeutycznych są: zdolność do infiltracji (naciekania zdrowych tkanek), przez którą nawet bardzo dokładna resekcja guza jest nieskuteczna oraz oporność na chemio- i radioterapię [Van Meir i wsp., 2010].

Kluczową rolę w biologii glejaków odgrywa cykl glutamina (Gln)/glutaminian (Glu), którego poszczególne elementy są zaburzone w tych nowotworach. Gln jest wykorzystywana w procesie proliferacji jako jeden z podstawowych substratów energetycznych, a także źródło atomów azotu wykorzystywanych do syntezy nukleotydów i białek [Cheng i wsp., 2011]. Ponadto, będąc aminokwasem niezbędnym do regulacji objętości komórki glejaka, bierze udział w procesie migracji tych komórek [Ernest i Sontheimer, 2007]. Intensywny metabolizm Gln w komórkach glejaka możliwy jest między innymi dzięki wzmożonemu transportowi tego aminokwasu przez błonę komórkową. Nadekspresję genu *ASCT2* kodującego transporter Gln należącego do systemu ASC stwierdzono w ludzkich glejakach o najwyższych stopniach złośliwości [Sidoryk i wsp., 2004] oraz w linii glejaka szczurzego C6, a badania funkcjonalne potwierdziły dominującą rolę systemu ASC w transporcie Gln w tych komórkach [Dolińska i wsp., 2003]. Gln metabolizowana jest do glutaminianu (Glu) i jonów amonowych przez aktywowaną fosforanem glutaminazę (GA, EC 3.5.1.2). Wysoka aktywność poszczególnych izoform glutaminazy jest cechą charakterystyczną komórek linii nowotworowych i nowotworów o różnej histogenezie, także GBM [Szeliga i Obara-Michlewska, 2009]. Wzmożony metabolizm Gln prowadzi do intensywnej produkcji Glu, który działa neurotoksycznie i ma ogromne znaczenie dla wzrostu guza oraz migracji komórek [Sontheimer, 2008]. W przypadku glejaków stwierdzono zarówno zwiększony wyrzut Glu, spowodowany nadekspresją antyportera cystynowo-glutaminianowy X<sup>c</sup> [Ye i

wsp., 1999; Sontheimer, 2008], jak i zahamowanie wychwyty zwrotnego tego aminokwasu wynikające z obniżonej ekspresji i nieprawidłowej lokalizacji dwóch innych transporterów Glu, EAAT1 i EAAT2 [Ye i wsp., 1999]. Glu jest prekursorem jednego z podstawowych antyoksydantów komórkowych, glutationu (GSH), którego poziom jest podwyższony w komórkach linii GBM i może przyczyniać się do oporności tych komórek na działanie stresu oksydacyjnego i czynników alkilujących stosowanych w terapii GBM [Iida i wsp., 1997; Ali-Osman i wsp., 1990].

Istotna rola, jaką Gln odgrywa w biologii nowotworów spowodowała wzrost zainteresowania GA. W komórkach ssaków zidentyfikowano dwa geny kodujące ten enzym zlokalizowane na różnych chromosomach. Gen *Gls* koduje izoformy typu nerkowego (kidney-type, KGA), obecnie określane jako Gls, gen *Gls2* koduje izoformy typu wątrobowego (liver-type, LGA), obecnie określane jako Gls2 [Campos-Sandoval i wsp., 2015]. Z genu *Gls* powstają co najmniej dwa transkrypty: dłuższy KGA, pierwotnie wyizolowany ze szczurzego mózgu [Banner i wsp., 1988] i nerki [Shapiro i wsp., 1991] oraz krótszy GAC, którego obecność po raz pierwszy stwierdzono w nerce, trzustce, sercu, płucach i komórkach raka piersi [Elgadi i wsp., 1999]. Dotychczas zidentyfikowano także dwa transkrypty powstające z genu *Gls2*: krótszy LGA, pierwotnie wyizolowany ze szczurzej wątroby [Smith i Watford, 1990] oraz dłuższy GAB, po raz pierwszy wyizolowany z komórek raka piersi [Gomez-Fabre i wsp., 2000]. Przez wiele lat wydawało się, że izoformy Gls ulegają ekspresji we wszystkich tkankach z wyjątkiem wątroby, natomiast ekspresja genu *Gls2* ograniczona jest tylko do tego organu [Curthoys i Watford, 1995], jednak w ostatnich dwóch dekadach stwierdzono obecność izoform Gls2 także w mózgu, trzustce oraz komórce układu odpornościowego [Aledo i wsp., 2000; Castell i wsp., 2004]. Coraz więcej danych wskazuje na fakt koekspresji obu genów GA w różnych typach komórek i tkankach, także zmienionych nowotworowo [Olalla i wsp., 2002; Perez-Gomez i wsp., 2005; Martin-Rufian i wsp., 2012; Cardona i wsp., 2015]. Przyczyny tego kosztownego energetycznie zjawiska nie są znane, wydaje się jednak, że poszczególne izoformy GA pełnią odmienne role. Hipoteza ta powstała na podstawie zaskakujących obserwacji: i). w neuronach i astrocytach GAB zlokalizowana jest nie tylko w mitochondriach, ale także jądrach komórkowych [Olalla i wsp., 2002; Cardona i wsp., 2015]; ii). w obrębie sekwencji GAB występują motywy charakterystyczne dla białek oddziałujących z innymi białkami [Olalla i wsp., 2002]; zidentyfikowano dwa białka, z którymi GAB wchodzi w interakcję [Olalla i wsp., 2001]. Powyższe obserwacje sugerują, że GAB może pełnić poza enzymatyczną także inne funkcje,

np. modulatora transkrypcji.

Rozregulowana ekspresja i/lub aktywność poszczególnych izoform glutaminazy jest cechą charakterystyczną komórek linii nowotworowych i nowotworów o różnej histogenezie [Szeliga i Obara-Michlewska, 2009]. Podwyższony w stosunku do tkanek nienowotworowych poziom izoform GLS stwierdzono w komórkach chłoniaka, raku piersi [Wang i wsp., 2010], jelita grubego [Huang i wsp., 2014], raku wątrobokomórkowym [Yu i wsp., 2015]. Zablockowanie GLS (poprzez wyciszenie ekspresji lub zastosowanie allosterycznych inhibitorów) hamuje wzrost komórek nowotworowych *in vitro* i *in vivo* [Lobo i wsp., 2000; Wang i wsp., 2010; van den Heuvel i wsp., 2012; Xiang i wsp., 2015]. Ekspresja *GLS* może być regulowana przez onkogen MYC [Gao i wsp., 2009], natomiast aktywność powstających z tego genu białek - przez kojarzone z nowotworzeniem GTPazy Rho i Nfk $\beta$  [Wang i wsp., 2010]. Rola izoform *GLS2* w procesie nowotworzenia wydaje się być znacznie bardziej skomplikowana i ściśle związana z typem komórek. Ich ekspresja jest charakterystyczną cechą komórek zróżnicowanych, nieulegających podziałom [Turner i McGivan, 2003; Perez-Gomez i wsp., 2005]. W 2010 roku dwie niezależne grupy badawcze wykazały że: i). w komórkach raka wątrobokomórkowego *GLS2* nie ulega ekspresji; ii). transfekcja komórek linii raka wątroby i płuc sekwencją kodującą *GLS2* hamuje ich proliferację; iii). ekspresja *GLS2* jest regulowana przez supresor nowotworowy p53 [Hu i wsp., 2010; Suzuki i wsp., 2010]. Brak ekspresji *GLS2* odnotowano również w komórkach jelita grubego i także w tym przypadku transfekcja sekwencją kodującą *GLS2* zahamowała proliferację komórek [Zhang i wsp., 2013]. Najnowsze dane wskazują, że *GLS2* hamuje działanie GTPazy Rac1 zaangażowanej w procesy migracji i inwazyjności komórek nowotworowych [Zhang i wsp., 2016].

W GBM izoformy kodowane przez gen *GLS* ulegają silnej ekspresji, natomiast izoformy kodowane przez gen *GLS2* ulegają ekspresji jedynie w śladowych ilościach [Szeliga i wsp., 2005]. Transfekcja ludzkich komórek GBM T98G sekwencją kodującą izoformę GAB znacznie obniżyła ich przeżywalność, potencjał proliferacyjny i zdolności migracyjne oraz zmodyfikowała poziom ekspresji licznych genów, z których część koduje białka związane z procesem nowotworzenia [Szeliga i wsp., 2009]. Powyższe obserwacje stały się punktem wyjścia do kolejnych badań, których wyniki przedstawiono w publikacjach składających się na osiągnięcie habilitacyjne. W trzech pracach materiałem badawczym były tkanki i/lub komórki GBM, natomiast w czwartej pracy skoncentrowaliśmy się na guzach neuroendokrynnych układu pokarmowego (gastroenteropancreatic NETs, GEP-NETs). Guzy neuroendokrynne (neuroendocrine tumors, NETs) wywodzące się z komórek

neuroendokrynych mogą występować w różnych organach, jednak zdecydowaną większość stanowią guzy neuroendokryne układu pokarmowego [Verbeek et al., 2015]. GEP-NETs są rzadkimi nowotworami: roczna zapadalność na nie wynosi 2-5/100 000, a pięcioletni okres przeżycia dotyczy 63% pacjentów [Scherübl i wsp. 2013]. Leczenie GEP-NETs obejmuje postępowanie chirurgiczne, chemioterapię, leczenie radioizotopowe z użyciem analogów somatostatyny oraz celowane farmakoterapie [Verbeek et al., 2015]. Najnowsza klasyfikacja dzieli GEP-NETs ze względu na stopień dojrzałości histologicznej na nowotwory o wysokim (G1), średnim (G2) lub niskim (G3) stopniu zróżnicowania, przy czym guzy G1 charakteryzują się niskim indeksem proliferacji (Ki67<3%), G2 – umiarkowanym (Ki67=3%-20%), G3 – wysokim (Ki67>20%) [Klimstra i wsp., 2010].

*Cele cyklu omawianych prac obejmowały:*

1. zdefiniowanie przyczyn braku ekspresji *GLS2* w GBM;
2. zbadanie wpływu transfekcji komórek linii T98G sekwencją GAB na wrażliwość na czynniki alkilujące;
3. określenie czy na skutki nadekspresji GAB w komórkach T98G nałoży się zablokowanie pozostałych izoform GA;
4. zbadanie poziomu poszczególnych transkryptów GA w umiarkowanie proliferujących guzach GEP-NET.

*Zahamowanie ekspresji *GLS2* w GBM jest konsekwencją metylacji DNA (poz. 4.1).*

Obserwacja braku ekspresji *GLS2* w GBM [Szeliga i wsp., 2005] zrodziła pytanie o przyczyny tego zjawiska. Jak wspomniano we *Wstępie*, jednym z czynników transkrypcyjnych kontrolujących ekspresję *GLS2* jest białko supresorowe p53 [Hu i wsp., 2010; Suzuki i wsp., 2010]. Gen *TP53* jest zmutowany w ok. 30% pierwotnych i ok. 65% wtórnych GBM [Crespo i wsp., 2015]. W celu sprawdzenia korelacji między poziomem ekspresji *GLS2* i statusem *TP53* w komórkach linii GBM zbadaliśmy ekspresję *GLS2* w komórkach dwóch komercyjnie dostępnych linii glioblastoma ludzkiego U-87 MG i T98G. Komórki U-87 MG ekspresyjnie mają funkcjonalne białko p53, natomiast komórki T98G mają zmutowaną wersję genu *TP53*, czego konsekwencją jest brak aktywnego białka p53 [Van Meir i wsp., 1994]. W komórkach żadnej z tych linii nie stwierdziliśmy ekspresji genu *GLS2*.

W kolejnych badaniach przetestowaliśmy hipotezę zakładającą, że brak ekspresji *GLS2* w GBM jest konsekwencją metylacji tego genu. Metylacja cytozyny w obrębie dinukleotydowej sekwencji CpG w DNA prowadzi do wyciszenia ekspresji genu.

Dinukleotydy CpG mogą być rozproszone w genomie lub występować w skupiskach tworząc tzw. wyspy CpG. W prawidłowych komórkach wyspy CpG zlokalizowane w promotorach genów najczęściej pozostają niezmetylowane, natomiast wyspy CpG zlokalizowane poza obszarem promotora oraz dinukleotydy CpG są zmetylowane [Fan i Zhang, 2009]. Komórki nowotworowe o różnej histogenezie wykazują odmienny niż komórki prawidłowe wzór metylacji DNA. W komórkach GBM obserwuje się globalną demetylację genomu, której towarzyszy hipermetylacja w obrębie promotorów genów supresorowych [Martinez i Esteller, 2010]. Kanoniczny promotor genu *GLS2*, odpowiadający za transkrypcję izoformy GAB, zawiera liczne wyspy CpG [Martin-Rufian i wsp., 2012]. Metylacja tych wysp jest mechanizmem odpowiedzialnym za wyciszenie *GLS2* w komórkach raka jelita grubego [Zhang i wsp., 2013] i raka wątrobokomórkowego [Zhang i wsp., 2013; Liu i wsp., 2014]. W naszych badaniach traktowanie komórek linii T98G i U-87 MG czynnikiem demetylującym, 5-aza-2'-deoksytydyną (5-aza) doprowadziło do odblokowania *GLS2*, co wskazywało, że metylacja jest procesem odpowiedzialnym za brak jego ekspresji w tych komórkach.

Następnym etapem badań była analiza sekwencji *GLS2* (sekwencja w GenBank AF348119) pod kątem lokalizacji wysp CpG, zdefiniowanych jako obszar DNA o długości min. 200 par zasad (pz), o zawartości GC>50% i współczynniku „observed/expected CpG”>0.6 [Gardiner-Garden i Frommer, 1987]. Analiza wykazała obecność dwóch wysp CpG - jednej w obszarze promotora (CpG1), drugiej w obszarze pierwszego intronu (CpG2). Ponadto w obszarze promotora zidentyfikowano region o bardzo wysokiej zawartości GC, który jednak nie spełnia wszystkich kryteriów stawianych przez definicję wyspy CpG ze względu na długość (100 pz), dlatego został określony jako „CpGr”. Szczegółowa charakterystyka obu wysp CpG oraz obszaru CpGr jest przedstawiona w tabeli 1.

Tab.1. Obszary bogate w dinukleotydy CpG zidentyfikowane w genie *GLS2*.

	długość [pz]	pozycja w sekwencji AF348119 (GeneBank)	współczynnik „observed/expected CpG”	zawartość GC [%]	liczba dinukleotydów CpG
CpG1	471	1956-2426	0.87	64.97	41
CpG2	484	2998-3481	0.78	60.33	29
CpGr	100	2625-2724	0.88	67	7



W komórkach T98G zarówno CpG1, jak i CpG2 są całkowicie zmetylowane, natomiast rejon CpGr jest zmetylowany częściowo. W komórkach U-87 MG wyspa CpG1 jest całkowicie zmetylowana, natomiast CpG2 i CpGr są zmetylowane częściowo. Traktowanie komórek obu linii 5-aza-2'-deokycydydą znacznie obniża poziom metylacji w każdym z wyżej wymienionych obszarów.

Ostatnim etapem badań była analiza zależności pomiędzy poziomem ekspresji *GLS2*, poziomem metylacji CpG1, CpG2, CpGr i statusem *TP53* w materiale klinicznym. Analizie poddano siedem tkanek GBM i dwie tkanki mózgowe niezmiennone nowotworowo, traktowane jako materiał kontrolny. W sześciu tkankach GBM gen *GLS2* nie ulegał ekspresji, w jednej tkance GBM zaobserwowano śladową ilość transkryptu *GLS2*, natomiast w obu tkankach kontrolnych *GLS2* ulegał silnej ekspresji. Wyspa CpG1 zlokalizowana w rejonie promotora była zmetylowana we wszystkich tkankach GBM i w żadnej z tkanek kontrolnych, co potwierdza hipotezę zakładającą wpływ metylacji w obrębie CpG1 na wyciszenie *GLS2* w GBM. Wyspa CpG2 zlokalizowana w pierwszym intronie *GLS2* nie była zmetylowana w tkankach kontrolnych, natomiast wykazywała zróżnicowany poziom metylacji w GBM, nie można zatem wykluczyć że metylacja tego obszaru również wpływa na wyciszenie *GLS2* w GBM. Metylację rejonu CpGr zaobserwowano tylko w jednej z sześciu tkanek GBM, co sugeruje, że ten obszar nie pełni istotnej roli w wyciszeniu *GLS2* poprzez metylację.

W celu oznaczenia statusu *TP53* przeprowadzono sekwencjonowanie wysoce konserwatywnego regionu obejmującego egzony 5-8, który najczęściej ulega mutacjom zarówno w glejakach, jak i w innych nowotworach innych tkanek [Fule i wsp., 1992 i odnośniki literaturowe tamże]. W dwóch spośród siedmiu tkanek GBM stwierdzono mutacje punktowe prowadzące do substytucji Ala→Val lub Arg→Trp. Dane literaturowe sugerują, że konsekwencją każdej z tych mutacji jest powstanie nieaktywnego białka p53 [Lee i wsp., 2012; Freed-Pastor i Prives, 2012]. Wpływ zidentyfikowanych mutacji w *TP53* na poziom ekspresji *GLS2* jest niejasny. W jednej z tkanek wykazujących mutację *TP53* nie stwierdzono ekspresji *GLS2*, a jednocześnie zaobserwowano całkowitą metylację CpG1 i częściową metylację CpG2. Druga mutacja *TP53* została zidentyfikowana w tkance ekspresyjnej śladową ilość *GLS2*, z silnie zmetylowaną CpG1 i niezmetrylowaną CpG2. Pomimo tych niejasności, rola metylacji DNA jako głównego procesu wyciszającego *GLS2* w GBM jest bezsporna.

**Transfekcja komórek glioblastoma T98G sekwencją kodującą GAB uwrażliwia te komórki na działanie czynników alkilujących poprzez obniżenie ekspresji i aktywności metylotransferazy O<sup>6</sup> metyloguaniny (MGMT) (poz. 4.2).**

Transfekcja komórek linii glioblastoma T98G sekwencją kodującą GAB rozregulowała poziom ekspresji licznych genów [Szeliga i wsp., 2009]. Jednym z genów, których ekspresja uległa obniżeniu w transfekowanych komórkach, nazwanych TGAB, jest gen *MGMT* kodujący metylotransferazę O<sup>6</sup> metyloguaniny (MGMT, EC 2.1.1.63). MGMT naprawia DNA poprzez przenoszenie grup alkilowych z pozycji O<sup>6</sup> guaniny do własnego centrum aktywnego, czego konsekwencją jest zablokowanie aktywności i ubikwitynylacja białka [Christmann i wsp., 2011]. Grupy alkilowe dołączane są do pozycji O<sup>6</sup> guaniny przez stosowane w terapii guzów mózgu związki alkilujące, a ich obecność w DNA prowadzi do mutacji punktowych lub błędnie sparowanych zasad i w konsekwencji do indukcji śmierci komórkowej, stąd MGMT jest jednym z podstawowych elementów obronnych komórki przed skutkami działania związków alkilujących [Christmann i wsp., 2011]. W różnych modelach GBM wysoki poziom MGMT koreluje z dużą opornością na działanie związków alkilujących [Nagane i wsp., 1997; Kitange i wsp., 2009; Yoshino i wsp., 2009]. Liczne doniesienia wskazują również na związek pomiędzy poziomem MGMT a odpowiedzią na terapię związkami alkilującymi u pacjentów z GBM [Mineura i wsp., 1993; Belanich i wsp., 1996; Hegi i wsp., 2005; Wiewrodt i wsp., 2008]. Najlepiej poznanym mechanizmem odpowiedzialnym za regulację ekspresji *MGMT* jest metylacja promotora tego genu [Jacinto i Esteller, 2007].

Powyższe dane pozwoliły sformułować hipotezę, że komórki TGAB są bardziej wrażliwe na działanie związków alkilujących niż komórki kontrolne: dzięki T98G i transferowane pustym wektorem, TpcDNA. W pierwszym etapie badań wykazaliśmy, że komórki TGAB mają znacząco niższy w stosunku do komórek kontrolnych poziom białka MGMT, co przekłada się także na obniżony poziom aktywności tego enzymu. Ponadto komórki TGAB charakteryzowały się znacznie większą wrażliwością na działanie dwóch czynników alkilujących, temozolomidu (TMZ) i karmustyny (BCNU), co zaobserwowano mierząc przeżywalność komórek po 72h inkubacji z każdym ze związków oraz ich zdolność do formowania kolonii w czasie 3 tygodniowej inkubacji z TMZ lub BCNU.

Jak wspomniano wcześniej, jednym z najlepiej poznanych dotychczas mechanizmów odpowiedzialnych za obniżoną ekspresję *MGMT* jest metylacja w obrębie promotora tego genu [Jacinto i Esteller, 2007]. Powstała zatem hipoteza, że transfekcja sekwencją GAB

proceeds to changes in the methylation pattern of the *MGMT* gene, which would be followed by the observed decrease in *MGMT* expression in TGAB cells. We analyzed the methylation level of the *MGMT* promoter in TGAB and control cells using the technique of methylation-specific PCR (MSP-PCR) and primers covering CpG islands identified on the basis of clinical studies as the most important for the process of *MGMT* expression [Christmann et al., 2010]. The analysis did not show any qualitative or quantitative differences in the methylation of the *MGMT* promoter between TGAB and control cells. It is possible that transfection of the T98G cells with the GAB coding sequence changes the methylation level in the CpG islands not analyzed, leading to the downregulation of *MGMT*. Another potential cause of the decreased expression of this gene in TGAB cells could be the dysregulation of the activity of the transcription factor(s) influencing the *MGMT* expression. In the *MGMT* promoter region, there are binding sites for transcription factors AP-1, AP-2, Sp1, GRE [Harris et al., 1991] and NF- $\kappa$ B [Lavon et al., 2007]. At the same time, the role of AP-2 in the regulation of *MGMT* expression of all the above-mentioned factors, with the exception of AP-2 [Costello et al., 1994; Boldogh et al., 1998; Biswas et al., 1999; Lavon et al., 2007; Bocangel et al., 2009]. In TGAB cells, the expression of the *RYK* gene, which encodes a protein belonging to the family of tyrosine kinase receptors (receptor tyrosine kinase, RTK) [Szeliga et al., 2009]. This receptor is one of the elements of the non-canonical Wnt signaling pathway, which regulates the activity of AP-1 and protein kinase C (protein kinase C, PKC) [Katoh and Katoh, 2007], which in turn influences the activity of NF- $\kappa$ B [La Porta and Camolli, 1998]. Additionally, our own studies showed that in TGAB cells, the expression of the phosphorylated form of protein kinase B (AKT) [data not published], another element of the non-canonical Wnt signaling pathway, which influences the activity of NF- $\kappa$ B [Han et al., 2010]. It seems therefore likely that transfection of the T98G cells with the GAB coding sequence dysregulates the non-canonical Wnt signaling pathway, leading to the downregulation of *MGMT* expression.

***Wyciszenie GLS wzmacnia antyproliferacyjny efekt wywołany nadekspresją GLS2 w komórkach GBM linii T98G (poz. 4.3).***

As mentioned in the *Introduction*, in many types of tumors, also in GBM, a very high level of the *GLS* isoform is observed, and the inhibition of its expression or activity inhibits the proliferation of tumor cells both in *in vitro* models, as well as *in vivo*. It thus arises the question, what effect on proliferation and survival of glioblastoma cells will have the simultaneous downregulation of *GLS* and overexpression of *GLS2*. In the cells of the T98G line

glioblastoma T98G oraz TGAB (T98G stabilnie transfekowanych sekwencją kodującą GAB) wyciszyliśmy gen *GLS*. Zastosowane siRNA były zaprojektowane tak, by degradacji ulegały oba transkrypty powstające z tego genu: KGA oraz GAC. Zarówno w komórkach T98G, jak i TGAB wyciszenie *GLS* pociągnęło za sobą spadek przeżywalności i potencjału proliferacyjnego, co jest zgodne z wynikami otrzymanymi przez inne grupy [Cheng i wsp., 2011; Martin-Rufian i wsp., 2014]. Ponadto w przypadku obu linii przeżywalność i potencjał proliferacyjny komórek po wyciszeniu *GLS* były negatywnie skorelowane z wewnątrzkomórkowym poziomem Gln, co podkreśla istotność tego aminokwasu dla wzrostu komórek glioblastoma.

Dzięki wyciszeniu *GLS* w komórkach T98G i TGAB otrzymaliśmy dwie kolejne linie GBM: T98G-GLS i TGAB-GLS, zatem w dalszej analizie wykorzystaliśmy cztery linie różniące się liczbą izoform GA, poziomem Gln oraz przeżywalnością i potencjałem proliferacyjnym. Podstawową funkcją białek kodowanych przez *GLS* i *GLS2* jest metabolizm Gln, co sugeruje że:

1. najwolniej powinny proliferować komórki T98G-GLS, ekspresyjujące jedynie śladowe ilości GLS, a w konsekwencji charakteryzujące się najwyższym poziomem Gln, która nie jest metabolizowana w komórce;
2. najszybciej powinny proliferować komórki TGAB, zawierające trzy izoformy GA, o niskim poziomie Gln;
3. komórki, zawierające jedną (TGAB-GLS) lub dwie (T98G) izoformy GA i w rezultacie charakteryzujące się pośrednim poziomem Gln powinny wykazywać umiarkowane tempo proliferacji.

Zaskakująco, pomimo znacznie niższego wewnątrzkomórkowego poziomu Gln, komórki TGAB zawierające trzy izoformy GA charakteryzowały się niższą przeżywalnością i potencjałem proliferacyjnym, niż komórki T98G zawierające dwie izoformy GA. Ponadto komórki TGAB-GLS ekspresyjujące jedną izoformę GA i zawierające umiarkowany poziom Gln wykazywały niższą przeżywalność i potencjał proliferacyjny niż komórki T98G-GLS, w których nie uległ ekspresji żaden z genów kodujących GA, a poziom Gln był najwyższy. Wyniki te umacniają hipotezę zakładającą, że białka kodowane przez gen *GLS* odgrywają w procesie proliferacji przeciwną rolę do białek powstających z genu *GLS2*.

#### ***Ekspresja izoform GA w guzach neuroendokrynych układu pokarmowego (poz. 4.4).***

W ostatnich latach znacznie wzrosła liczba doniesień dokumentujących rozregulowany poziom ekspresji poszczególnych izoform GA w nowotworach o różnej

histogenezie wzmacniającej hipotezę zakładającą, że wysoka ekspresja izoform GLS jest cechą charakterystyczną dla komórek szybko proliferujących, natomiast izoformy GLS2 ulegają ekspresji przede wszystkim w komórkach słabo proliferujących, zróżnicowanych. W ostatniej pracy włączonej do cyklu habilitacyjnego przeprowadziliśmy analizę ekspresji *GLS* i *GLS2* w GEP-NETs. W pracy wykorzystaliśmy 7 nowotworowych tkanek pobranych od pacjentów z GEP-NET czasie resekcji lub biopsji. Dwie z tkanek zostały zakwalifikowane do grupy G1, pięć do grupy G2. W kolejnych analizach wszystkie badane tkanki nowotworowe traktowano wspólnie, jako guzy o umiarkowanej proliferacji i zróżnicowaniu. Nie mieliśmy natomiast dostępu do silnie proliferujących guzów G3. W czasie obserwacji klinicznej 3 pacjentów zmarło, a mediana całkowitego przeżycia wyniosła 72 miesiące. Mediana całkowitego przeżycia pozostałych pacjentów wyniosła 132 miesiące. Grupę kontrolną stanowiło 7 nienowotworowych tkanek trzustki.

Poziom izoformy KGA w tkankach GEP-NETs był znamienne wyższy niż w tkankach kontrolnych: jej obecność stwierdzono we wszystkich 7 tkankach nowotworowych i tylko 4 z 7 nienowotworowych. W materiale pobranym od pacjentów z GEP-NET, którzy zmarli zaobserwowano tendencję wzrostową w poziomie transkryptu KGA w porównaniu do tkanek uzyskanych od pacjentów, którzy żyją. Konieczna jest dalsza analiza obejmująca większą liczbę tkanek GEP-NET aby stwierdzić, czy izoforma KGA mogłaby posłużyć jako w przypadku tych nowotworów.

Zarówno w tkankach GEP-NET, jak i kontrolnych najsilniejszej ekspresji ulegała izoforma GAC, przy czym nie zaobserwowano różnic w jej poziomie pomiędzy tkankami nowotworowymi i nienowotworowymi. Nie stwierdzono także różnic w poziomie tej izoformy pomiędzy tkankami uzyskanymi od pacjentów, którzy zmarli w stosunku do tkanek od pacjentów, którzy nadal żyją. Nie zaobserwowano różnic w poziomie ekspresji genu *GLS2* pomiędzy tkankami GEP-NET i nienowotworowymi. W materiale pobranym od pacjentów z GEP-NET, którzy zmarli zaobserwowano tendencję spadkową w poziomie ekspresji tego genu w porównaniu do tkanek uzyskanych od pacjentów, którzy żyją.

Przedstawione powyżej wyniki są kolejną dokumentacją koekspresji kilku izoform GA w jednym typie tkanki. W przebadanych przez nas GEP-NET o umiarkowanym stopniu proliferacji dominującą izoformą była GAC, w poziomie której nie odnotowaliśmy różnic porównując materiał nowotworowy do tkanek kontrolnych. Jednocześnie zaobserwowaliśmy zwiększony w stosunku do tkanek kontrolnych poziom izoformy KGA, zatem stosunek izoformy GAC do KGA jest niższy w GEP-NET, niż w tkankach nienowotworowych. Trudno na tym etapie badań przesądzić, czy i jaką rolę w określeniu fenotypu GEP-NET ma wzrost

słabo reprezentowanej izoformy KGA. Analiza poziomu poszczególnych izoform GA w niedostępnej nam grupie GEP-NET o wysokim indeksie proliferacji przybliżyłaby odpowiedź na powyższe pytanie. Warto podkreślić, że w nowotworach intensywnie proliferujących, takich jak GBM [Szeliga i wsp., 2005] i niedrobnokomórkowym raku płuc [van den Heuvel i wsp., 2012], względna ekspresja GAC była bardzo wysoka.

#### **Podsumowanie:**

**W przedstawionych powyżej pracach wykazaliśmy że:**

- 1. Brak ekspresji izoformy GLS2 w komórkach natywnych i liniach komórkowych GBM wynika głównie z wyciszenia *GLS2* w wyniku metylacji DNA w obrębie promotora, a także częściowo w obrębie pierwszego intronu.**
- 2. Transfekcja komórek linii GBM T98G sekwencją kodującą GAB obniża poziom i aktywność MGMT, białka naprawiającego DNA, co pociąga za sobą wzrost wrażliwości tych komórek na działanie czynników alkilujących stosowanych w terapii GBM.**
- 3. Zablockowanie w komórkach linii GBM T98G ekspresji *GLS* wzmacnia antyproliferacyjny efekt osiągnięty poprzez nadekspresję izoformy GAB.**
- 4. Umiarkowanie proliferujące guzy GEP-NET charakteryzują się w porównaniu do tkanek kontrolnych znacznie zwiększoną ekspresją jednej z izoform GLS – KGA, przy niezmiennym poziomie izoformy GAC. Poziom ekspresji genu *GLS2* w tych nowotworach nie różni się od poziomu zaobserwowanego w tkankach kontrolnych.**

W sumie, uzyskane wyniki z jednej strony wskazują przyczynę wyciszenia *GLS2* w komórkach linii GBM i tkankach uzyskanych od pacjentów z tym nowotworem, z drugiej zaś poszerzają wiedzę dotyczącą mechanizmu działania izoformy GLS2 - GAB w komórkach GBM transfekowanych sekwencją kodującą to białko. Jednocześnie wzmacniają one hipotezę zakładającą, że geny GLS i GLS2 kodują izoformy pełniące przeciwstawne role w kształtowaniu fenotypu nowotworów złośliwych ośrodkowego układu nerwowego. Ten prosty schemat prawdopodobnie nie odnosi się do guzów neuroendokrynych: skutki zmian w ekspresji poszczególnych izoform glutamina w tej klasie nowotworów stanowią interesujące wyzwanie badawcze na przyszłość.

#### **Literatura:**

- Ali-Osman F, Stein DE, Renwick A: Glutathione content and glutathione-5'-transferase expression in 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea-resistant human malignant astrocytoma cell lines. *Cancer Res.* 1990;50:6976-6980.
- Banner C, Hwang JJ, Shapiro RA, Wenthold RJ, Nakatani Y, Lampel KA, Thomas JW, Huie D, Curthoys NP. Isolation of a cDNA for rat brain glutaminase. *Brain Res.* 1988;427:247-254.

- Belanich M, Pastor M, Randall T, Guerra D, Kibitel J, Alas L, Li B, Citron M, Wasserman P, White A, Eyre H, Jaeckle K, Schulman S, Rector D, Prados M, Coons S, Shapiro W, Yarosh D. Retrospective study of the correlation between the DNA repair protein alkyltransferase and survival of brain tumor patients treated with carmustine. *Cancer Res.* 1996;56:783-788.
- Biswas T, Ramana CV, Srinivasan G, Boldogh I, Hazra TK, Chen Z, Tano K, Thompson EB, Mitra S. Activation of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene by glucocorticoid hormone. *Oncogene* 1999;18:525-532.
- Bocangel D, Sengupta S, Mitra S, Bhakat KK. p53-Mediated down-regulation of the human DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) via interaction with Sp1 transcription factor. *Anticancer Res.* 2009;29:3741-3750.
- Boldogh I, Ramana CV, Chen Z, Biswas T, Hazra TK, Grösch S, Grombacher T, Mitra S, Kaina B. Regulation of expression of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase via protein kinase C-mediated signaling. *Cancer Res.* 1998;58:3950-3956.
- Campos-Sandoval JA, Martín-Rufián M, Cardona C, Lobo C, Peñalver A, Márquez J. Glutaminases in brain: Multiple isoforms for many purposes. *Neurochem Int.* 2015;88:1-5. doi: 10.1016/j.neuint.2015.03.006.
- Cardona C, Sánchez-Mejías E, Dávila JC, Martín-Rufián M, Campos-Sandoval JA, Vitorica J, Alonso FJ, Matés JM, Segura JA, Norenberg MD, Rama Rao KV, Jayakumar AR, Gutiérrez A, Márquez J. Expression of Gls and Gls2 glutaminase isoforms in astrocytes. *Glia.* 2015;63:365-382. doi: 10.1002/glia.22758.
- Castell L, Vance C, Abbott R, Marquez J, Eggleton P. Granule localization of glutaminase in human neutrophils and the consequence of glutamine utilization for neutrophil activity. *J Biol Chem.* 2004;279:13305-13310.
- Cheng T, Sudderth J, Yang C, Mullen AR, Jin ES, Matés JM, DeBerardinis RJ. Pyruvate carboxylase is required for glutamine-independent growth of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:8674-8679.
- Christmann M, Nagel G, Horn S, Krahn U, Wiewrodt D, Sommer C, Kaina B. MGMT activity, promoter methylation and immunohistochemistry of pretreatment and recurrent malignant gliomas: a comparative study on astrocytoma and glioblastoma. *Int. J. Cancer* 2010;127:2106-2118.
- Christmann M, Verbeek B, Roos WP, Kaina B. O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Dec;1816(2):179-190. doi: 10.1016/j.bbcan.2011.06.002.
- Costello JF, Futscher BW, Kroes RA, Pieper RO. Methylation-related chromatin structure is associated with exclusion of transcription factors from and suppressed expression of the O-6-methylguanine DNA methyltransferase gene in human glioma cell lines. *Mol. Cell. Biol.* 1994;14:6515-6521.
- Crespo I, Vital AL, Gonzalez-Tablas M, Patino Mdel C, Otero A, Lopes MC, de Oliveira C, Domingues P, Orfao A, Taberero MD. Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme. *Am J Pathol.* 2015;185:1820-33. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.02.023.
- Curthoys NP, Watford M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu Rev Nutr.* 1995;15:133-59.
- Dolińska M, Dybel A, Zabłocka B, Albrecht J. Glutamine transport in C6 glioma cells shows ASCT2 system characteristics. *Neurochem Int.* 2003;43:501-507.
- Elgadi KM, Meguid RA, Qian M, Souba WW, Abcouwer SF. Cloning and analysis of unique human glutaminase isoforms generated by tissue-specific alternative splicing. *Physiol Genomics.* 1999;1:51-62.
- Ernest NJ, Sontheimer H. Extracellular glutamine is a critical modulator for regulatory volume increase in human glioma cells. *Brain Res.* 2007;1144:231-238.
- Fan S, Zhang X. CpG island methylation pattern in different human tissues and its correlation with gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;383:421-425. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.04.023.
- Felsher DW, Dang CV. Targeted inhibition of tumor-specific glutaminase diminishes cell-autonomous tumorigenesis. *J Clin Invest.* 2015;125:2293-2306. doi: 10.1172/JCI75836.
- Freed-Pastor WA, Prives C. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev.* 2012;26:1268-1286.
- Fults D, Brockmeyer D, Tullous MW, Pedone CA, Cawthon RM. p53 mutation and loss of heterozygosity on chromosomes 17 and 10 during human astrocytoma progression. *Cancer Res.* 1992;52:674-679.
- Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol.* 1987;196:261-282.

Gao P, Tchernyshyov I, Chang TC, Lee YS, Kita K, Ochi T, Zeller KI, De Marzo AM, Van Eyk JE, Mendell JT, Dang CV. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature*. 2009;458:762-765. doi: 10.1038/nature07823.

Gómez-Fabre PM, Aledo JC, Del Castillo-Olivares A, Alonso FJ, Núñez De Castro I, Campos JA, Márquez J. Molecular cloning, sequencing and expression studies of the human breast cancer cell glutaminase. *Biochem J*. 2000;345:365-375.

Han SS, Yun H, Son DJ, Tompkins VS, Peng L, Chung ST, Kim JS, Park ES, Janz S. NF-kappaB/STAT3/PI3K signaling crosstalk in iMyc E mu B lymphoma. *Mol Cancer*. 2010;9:97. doi: 10.1186/1476-4598-9-97.

Harris LC, Potter PM, Tano K, Shiota S, Mitra S, Brent TP. Characterization of the promoter region of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Nucleic Acids Res*. 1991;19:6163-6167.

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352:997-1003.

Hu W, Zhang C, Wu R, Sun Y, Levine A, Feng Z. Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:7455-60. doi: 10.1073/pnas.1001006107.

Huang F, Zhang Q, Ma H, Lv Q, Zhang T. Expression of glutaminase is upregulated in colorectal cancer and of clinical significance. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7:1093-1100. eCollection 2014.

Iida M, Sunaga S, Hirota N, Kuribayashi N, Sakagami H, Takeda M, Matsumoto K: Effect of glutathione-modulating compounds on hydrogen-peroxide-induced cytotoxicity in human glioblastoma and glioma cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1997;123:619-622.

Jacinto FV, Esteller M. MGMT hypermethylation: a prognostic foe, a predictive friend. *DNA Repair (Amst)*. 2007;6:1155-1160.

Katoh M, Katoh M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res*. 2007;13:4042-4045.

Kitange GJ, Carlson BL, Schroeder MA, Grogan PT, Lamont JD, Decker PA, Wu W, James CD, Sarkaria JN. Induction of MGMT expression is associated with temozolomide resistance in glioblastoma xenografts. *Neuro Oncol*. 2009;11:281-291. doi: 10.1215/15228517-2008-090.

Klimstra DS, Modlin IR, Coppola D, Lloyd RV, Suster S. The pathologic classification of neuroendocrine tumors: a review of nomenclature, grading, and staging systems. *Pancreas* 2010;39:707-712.

La Porta CA, Comolli R. PKC-dependent modulation of Ikb alpha-NFkB pathway in low metastatic B16F1 murine melanoma cells and in highly metastatic BL6 cells. *Anticancer Res*. 1998;18:2591-2597.

Lavon I, Fuchs D, Zrihan D, Efroni G, Zelikovitch B, Fellig Y, Siegal T. Novel mechanism whereby nuclear factor kappaB mediates DNA damage repair through regulation of O(6)-methylguanine-DNA-methyltransferase. *Cancer Res*. 2007;67:8952-8959.

Lee DS, Yoon SY, Looi LM, et al. Comparable frequency of BRCA1, BRCA2 and TP53 germline mutations in a multi-ethnic Asian cohort suggests TP53 screening should be offered together with BRCA1/2 screening to early-onset breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2012;14:R66.

Liu J, Zhang C, Lin M, Zhu W, Liang Y, Hong X, Zhao Y, Young KH, Hu W, Feng Z. Glutaminase 2 negatively regulates the PI3K/AKT signaling and shows tumor suppression activity in human hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2014;5:2635-2647.

Lobo C, Ruiz-Bellido MA, Aledo JC, Márquez J, Núñez De Castro I, Alonso FJ. Inhibition of glutaminase expression by antisense mRNA decreases growth and tumorigenicity of tumour cells. *Biochem J*. 2000;348 Pt 2:257-261.

Martin-Rufián M, Nascimento-Gomes R, Higuero A, Crisma AR, Campos-Sandoval JA, Gómez-García MC, Cardona C, Cheng T, Lobo C, Segura JA, Alonso FJ, Szeliga M, Albrecht J, Curi R, Márquez J, Colquhoun A, Deberardinis RJ, Matés JM. Both GLS silencing and GLS2 overexpression synergize with oxidative stress against proliferation of glioma cells. *J Mol Med (Berl)*. 2014;92:277-290. doi: 10.1007/s00109-013-1105-2.

Martin-Rufian M, Tosina M, Campos-Sandoval JA, et al. Mammalian glutaminase Gls2 gene encodes two functional alternative transcripts by a surrogate promoter usagemechanism. *PLoS One* 2012;7(6):e38380.



- Martinez R, Esteller M. The DNA methylome of glioblastoma multiforme. *Neurobiol Dis.* 2010 Jul;39(1):40-46. doi: 10.1016/j.nbd.2009.12.030.
- Mineura K, Izumi I, Watanabe K, Kowada M. Influence of O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity on chloroethylnitrosourea chemotherapy in brain tumors. *Int J Cancer.* 1993;55:76-81.
- Nagane M, Asai A, Shibui S, Nomura K, Kuchino Y. Application of antisense ribonucleic acid complementary to O6-methylguanine-deoxyribonucleic acid methyltransferase messenger ribonucleic acid for therapy of malignant gliomas. *Neurosurgery.* 1997;41:434-440; discussion 440-1.
- Olalla L, Aledo JC, Bannenberg G, Márquez J. The C-terminus of human glutaminase L mediates association with PDZ domain-containing proteins. *FEBS Lett.* 2001;488:116-122. Erratum in: *FEBS Lett* 2002;531:570.
- Olalla L, Gutiérrez A, Campos JA, Khan ZU, Alonso FJ, Segura JA, Márquez J, Aledo JC. Nuclear localization of L-type glutaminase in mammalian brain. *J Biol Chem.* 2002;277:38939-38944.
- Pérez-Gómez C, Campos-Sandoval JA, Alonso FJ, Segura JA, Manzanares E, Ruiz-Sánchez P, González ME, Márquez J, Matés JM. Co-expression of glutaminase K and L isoenzymes in human tumour cells. *Biochem J.* 2005;386:535-542.
- Scherübl H, Streller B, Stabenow R, Herbst H, Höpfner M, Schwertner C, Steinberg J, Eick J, Ring W, Tiwari K, Zappe SM. Clinically detected gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors are on the rise: epidemiological changes in Germany. *World J. Gastroenterol.* 2013;19:9012-9019.
- Shapiro RA, Farrell L, Srinivasan M, Curthoys NP. Isolation, characterization, and in vitro expression of a cDNA that encodes the kidney isoenzyme of the mitochondrial glutaminase. *J Biol Chem.* 1991;266:18792-18796.
- Sidoryk M, Matyja E, Dybel A, Zielinska M, Bogucki J, Jaskólski DJ, Liberski PP, Kowalczyk P, Albrecht J. Increased expression of a glutamine transporter SNAT3 is a marker of malignant gliomas. *Neuroreport.* 2004;15:575-578.
- Smith EM, Watford M. Molecular cloning of a cDNA for rat hepatic glutaminase. Sequence similarity to kidney-type glutaminase. *J Biol Chem.* 1990;265:10631-10636.
- Sontheimer H. A role for glutamate in growth and invasion of primary brain tumors. *J Neurochem.* 2008;105:287-295.
- Suzuki S, Tanaka T, Poyurovsky MV, Nagano H, Mayama T, Ohkubo S, Lokshin M, Hosokawa H, Nakayama T, Suzuki Y, Sugano S, Sato E, Nagao T, Yokote K, Tatsuno I, Prives C. Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:7461-7466. doi: 10.1073/pnas.1002459107.
- Szeliga M, Obara-Michlewska M. *Neurochem Int.* 2009;55:71-75. doi: 10.1016/j.neuint.2009.01.008.
- Szeliga M, Obara-Michlewska M, Matyja E, Łazarczyk M, Lobo C, Hilgier W, Alonso FJ, Márquez J, Albrecht J. Transfection with liver-type glutaminase cDNA alters gene expression and reduces survival, migration and proliferation of T98G glioma cells. *Glia.* 2009;57:1014-1023. doi: 10.1002/glia.20825.
- Szeliga M, Sidoryk M, Matyja E, Kowalczyk P, Albrecht J. Lack of expression of the liver-type glutaminase (LGA) mRNA in human malignant gliomas. *Neurosci Lett.* 2005;374:171-173.
- Turner A, McGivan JD. Glutaminase isoform expression in cell lines derived from human colorectal adenomas and carcinomas. *Biochem J.* 2003;370(Pt 2):403-408.
- Van den Heuvel AP, Jing J, Wooster RF, Bachman KE. Analysis of glutamine dependency in non-small cell lung cancer: GLS1 splice variant GAC is essential for cancer cell growth. *Cancer Biol Ther.* 2012;13:1185-1194. doi: 10.4161/cbt.21348.
- Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu HK, Wen PY, Olson JJ. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin.* 2010;60:166-193. doi: 10.3322/caac.20069.
- Van Meir EG, Kikuchi T, Tada M, Li H, Diserens AC, Wojcik BE, Huang HJ, Friedmann T, de Tribolet N, Cavenee WK. Analysis of the p53 gene and its expression in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 1994;54:649-652.
- Verbeek WH, Korse CM, Tesselaar ME. GEP-NETs UPDATE: Secreting gastro-enteropancreatic neuroendocrine tumours and biomarkers. *Eur J Endocrinol.* 2016;174:R1-7. doi: 10.1530/EJE-14-0971.

Wang JB, Erickson JW, Fuji R, Ramachandran S, Gao P, Dinavahi R, Wilson KF, Ambrosio AL, Dias SM, Dang CV, Cerione RA. Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Cell*. 2010;18:207-219. doi: 10.1016/j.ccr.2010.08.009. Erratum in: *Cancer Cell*. 2010 Oct 19;18(4):397.

Weller M, Cloughesy T, Perry JR, Wick W. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma--are we there yet? *Neuro Oncol*. 2013;15:4-27.

Wiewrodt D, Nagel G, Dreimüller N, Hundsberger T, Pernecky A, Kaina B. MGMT in primary and recurrent human glioblastomas after radiation and chemotherapy and comparison with p53 status and clinical outcome. *Int J Cancer*. 2008;122:1391-1399.

Xiang Y, Stine ZE, Xia J, Lu Y, O'Connor RS, Altman BJ, Hsieh AL, Gouw AM, Thomas AG, Gao P, Sun L, Song L, Yan B, Slusher BS, Zhuo J, Ooi LL, Lee CG, Mancuso A, McCallion AS, Le A, Milone MC, Rayport S, Felsner DW, Dang CV. Targeted inhibition of tumor-specific glutaminase diminishes cell-autonomous tumorigenesis. *J Clin Invest*. 2015;125:2293-2306. doi: 10.1172/JCI75836.

Ye ZC, Rothstein JD, Sontheimer H. Compromised glutamate transport in human glioma cells: reduction-mislocalization of sodium-dependent glutamate transporters and enhanced activity of cystine-glutamate exchange. *J Neurosci*. 1999;19:10767-10777.

Yoshino A, Ogino A, Yachi K, Ohta T, Fukushima T, Watanabe T, Katayama Y, Okamoto Y, Naruse N, Sano E. Effect of IFN-beta on human glioma cell lines with temozolomide resistance. *Int J Oncol*. 2009;35:139-148.

Yu D, Shi X, Meng G, Chen J, Yan C, Jiang Y, Wei J, Ding Y. Kidney-type glutaminase (GLS1) is a biomarker for pathologic diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6:7619-7631.

Zhang C, Liu J, Zhao Y, Yue X, Zhu Y, Wang X, Wu H, Blanco F, Li S, Bhanot G, Haffty BG, Hu W, Feng Z. Glutaminase 2 is a novel negative regulator of small GTPase Rac1 and mediates p53 function in suppressing metastasis. *Elife*. 2016;5:e10727. doi: 10.7554/eLife.10727.

Zhang J, Wang C, Chen M, Cao J, Zhong Y, Chen L, Shen HM, Xia D. Epigenetic silencing of glutaminase 2 in human liver and colon cancers. *BMC Cancer*. 2013;13:601. doi: 10.1186/1471-2407-13-601.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

### *Wpływ pochodnych 1,3,4-tiadiazolu na fenotyp komórek nowotworowych.*

W ramach obecnie prowadzonego projektu „*Nowe pochodne 1,3,4-tiadiazolu jako inhibitory kluczowych etapów cyklu glutamina-glutaminian w komórkach glioblastoma*” analizowaliśmy aktywność sześciu pochodnych 1,3,4-tiadiazolu w komercyjnie dostępnych liniach ludzkiego GBM. Wszystkie testowane związki znacząco obniżają przeżywalność, zdolność do formowania kolonii i proliferację komórek GBM, nie wykazując jednocześnie toksycznego działania w stosunku do pierwotnych szczurzych astrocytów, co czyni je potencjalnymi skutecznymi chemioterapeutykami. Hipoteza dotycząca mechanizmu działania tych związków zakładała, że hamują one cykl Gln-Glu. Powstała ona w oparciu o fakt, że strukturalnie związki te są zbliżone do selektywnego inhibitora izoformy GAC, bis-2-(5-fenylacetamido-1,3,4-tiadiazol-2-ilo)etylu (BPTES) [Shukla i wsp., 2012] oraz do licznej grupy inhibitorów transportera Gln ASCT2 [Oppedisano i wsp., 2012]. Analiza wewnątrzkomórkowego poziomu Gln i Glu w komórkach GBM traktowanych badanymi pochodnymi nie wykazała jednak zmian w poziomie żadnego z tych aminokwasów obalając powyższą hipotezę. Najbliższe badania będą skoncentrowane na poszukiwaniu mechanizmu

działania pochodnych 1,3,4-tiadiazolu w liniach GBM. We wcześniejszych doświadczeniach prowadzonych w ramach projektu „Badanie aktywności przeciwnowotworowej nowych pochodnych aminotiadiazoli”, którego kierownikiem był prof. dr hab. W. Rzeski (Zakład Biologii Medycznej, Instytut Medycyny Wsi, Lublin) wykazaliśmy, że 2-(4-fluorofenyloamino)-5-(2,4-dihydroksyfenylo)-1,3,4-tiadiazol (FABT) znacznie obniża proliferację komórek niedrobnokomórkowego raka płuc. W komórkach traktowanych tym związkiem zaobserwowaliśmy zahamowanie ścieżki ERK1/2 oraz zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1 (Juszczak i wsp., 2012).

#### ***Wpływ preparatów peptydowych na fenotyp komórek GBM.***

W projekcie badaliśmy wpływ krótkich peptydów otrzymane w wyniku lizy włosów ludzkich lub sierści zwierząt na fenotyp komórek komercyjnie dostępnych linii GBM. Podstawą do tego projektu była wcześniejsza obserwacja antyproliferacyjnej aktywności badanych peptydów w komórkach linii czerniaka [Markowicz i wsp., 2014]. Testowane związki znacząco hamowały przeżywalność, zdolność do formowania kolonii i proliferację komórek GBM nie wykazując działania cytotoksycznego względem szczurzych pierwotnych astrocytów ani linii mysich fibroblastów. Wyniki dotyczące wpływu preparatów peptydowych na fenotyp komórek GBM zostały objęte zgłoszeniem patentowym: Szeliga M, Lipkowski AW, Różycki K. 2014. Zgłoszenie patentowe krajowe nr 409389 (z dnia 07.09.2014) „Preparaty peptydowe do wspomagania terapii przeciwnowotworowej ośrodkowego układu nerwowego”.

#### ***Ekspresja genów kodujących transportery metali we krwi pacjentów z chorobą Huntingtona.***

Coraz liczniejsze dane sugerują istnienie zależności między zaburzoną homeostazą metali a chorobami neurodegeneracyjnymi [Dexter i wsp., 1991]. W ramach projektu „Znaczenie mitochondrialnego DNA i wybranych czynników epigenetycznych na przebieg kliniczny choroby Huntingtona” (kierownik: prof. dr hab. J. Limon, Katedra i Zakład Biologii i Genetyki, Gdański Uniwersytet Medyczny) testowaliśmy hipotezę zakładającą, że obserwowana w różnych modelach choroby Huntingtona (Huntington’s disease, HD) zaburzona homeostaza  $Cd^{2+}$  i  $Mn^{2+}$  [Trettel i wsp., 2000; Bartzokis i wsp., 2007; Williams i wsp., 2010] jest wynikiem rozregulowanej ekspresji transporterów tych metali. W projekcie porównaliśmy poziom ekspresji genów kodujących najistotniejsze transportery metali we krwi od pacjentów z HD i osób zdrowych. W materiale otrzymanym od pacjentów z HD stwierdziliśmy spadkową tendencję w poziomie *TF* kodującego transferynę i wzrostową

tendencję w poziomie *SLC11A2* kodującego transporter DMT1 w stosunku do poziomu tych transkryptów we krwi osób zdrowych. Czynnikiem uznawanym za przyczynę HD jest zwielokrotnienie sekwencji CAG kodującej Gln w obrębie genu huntingtyny (*HTT*) [Imarisio i wsp., 2008]. W naszych badaniach nie zaobserwowaliśmy korelacji pomiędzy poziomem *TF* i *SLC11A2* a liczbą powtórzeń CAG u pacjentów z HD (Szeliga i wsp., 2016).

#### ***Rola białek hydrolizujących peptydoglikan w bakteriach mlekowych Lactococcus lactis.***

W projekcie prowadzonym w Zakładzie Genetyki Molekularnej Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii (Groningen, Holandia) badaliśmy ekspresję i aktywność enzymów lizujących peptydoglikan budujący ścianę komórkową bakterii mlekowych *Lactococcus lactis* powszechnie wykorzystywanych w produkcji serów, w której kluczowym etapem jest proces lizy komórkowej bakterii [Lortal i Chapot-Chartier, 2005]. Nasze badania wykazały, że białkiem najefektywniej lizującym peptydoglikan szczepu *L. lactis* IL1403 jest amidaza Lytr (Steen i wsp., 2007). W drugiej części projektu wykazaliśmy, że innym ważnym dla procesu lizy *L. lactis* jest hydrolaza peptydoglikanowa AcmD oraz zidentyfikowaliśmy optymalne warunki dla aktywności enzymatycznej tego białka (Visweswaran i wsp., 2013).

#### ***Literatura:***

- Bartzokis G, Lu PH, Tishler TA, Fong SM, Oluwadara B, Finn JP, Huang D, Bordelon Y, Mintz J, Perlman S. Myelin breakdown and iron changes in Huntington's disease: pathogenesis and treatment implications. *Neurochem Res* 2007;32:1655-1664.
- Dexter DT, Carayon A, Javoy-Agid F, Agid Y, Wells FR, Daniel SE, Lees AJ, Jenner P, Marsden CD. Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain* 1991;114:1953-1975.
- Imarisio S., Carmichael J., Korolchuk V. et al. Huntington's disease: from pathology and genetics to potential therapies. *Biochem. J.* 2008;412:191-209.
- Juszczak M, Matysiak J, Szeliga M, Pożarowski P, Niewiadomy A, Albrecht J, Rzeski W. 2-Amino-1,3,4-thiadiazole derivative (FABT) inhibits the extracellular signal-regulated kinase pathway and induces cell cycle arrest in human non-small lung carcinoma cells. *Bioorg Med Chem Lett.* 2012;22:5466-5469. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.07.036.
- Lortal S, Chapot-Chartier MP. Role, mechanism and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *International Dairy Journal*, 2005;15:857-871.
- Markowicz S, Matalinska J, Kurzepa K, Bochynska M, Biernacka M, Samluk A, Dudek D, Skurzak H, Yoshikawa M, Lipkowski AW. Anticancer properties of peptide fragments of hair proteins. *PLoS One.* 2014 9:e98073. doi: 10.1371/journal.pone.0098073.
- Oppedisano F, Catto M, Koutentis PA, Nicolotti O, Pochini L, Koyioni M, Introcaso A, Michaelidou SS, Carotti A, Indiveri C. Inactivation of the glutamine/amino acid transporter ASCT2 by 1,2,3-dithiazoles: proteoliposomes as a tool to gain insights in the molecular mechanism of action and of antitumor activity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012;265:93-102. doi: 10.1016/j.taap.2012.09.011.
- Shukla K, Ferraris DV, Thomas AG, Stathis M, Duvall B, Delahanty G, Alt J, Rais R, Rojas C, Gao P, Xiang Y, Dang CV, Slusher BS, Tsukamoto T. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide 3 (BPTES) analogs as glutaminase inhibitors. *J Med Chem* 2012;55:10551-10563. doi: 10.1021/jm301191p.

Steen A, van Schalkwijk S, Buist G, Twigt M, Szeliga M, Meijer W, Kuipers O, Kok J, Hugenholtz J. Lytr, a phage-derived amidase is most effective in induced lysis of *Lactococcus lactis* compared with other lactococcal amidases and glucosaminidases. *Int Dairy J.* 2007;17:926-936.

Szeliga M, Różycka A, Jędrak P, Barańska S, Janik P, Jamrozik Z, Albrecht J. Expression of RNAs Coding for Metal Transporters in Blood of Patients with Huntington's Disease. *Neurochem Res.* 2016;41:101-106. doi: 10.1007/s11064-015-1737-4.

Trettel F, Rigamonti D, Hilditch-Maguire P, Wheeler VC, Sharp AH, Persichetti F, Cattaneo E, MacDonald ME. Dominant phenotypes produced by the HD mutation in STHdh(Q111) striatal cells. *Hum Mol Genet* 2000; 9:2799-2809.

Visweswaran GR, Steen A, Leenhouts K, Szeliga M, Ruban B, Hesseling-Meinders A, Dijkstra BW, Kuipers OP, Kok J, Buist G. AcmD, a homolog of the major autolysin AcmA of *Lactococcus lactis*, binds to the cell wall and contributes to cell separation and autolysis. *PLoS One.* 2013;8:e72167. doi: 10.1371/journal.pone.0072167. eCollection 2013.

Williams BB, Li D, Wegrzynowicz M, Vadodaria BK, Anderson JG, Kwakye GF, Aschner M, Erikson KM, Bowman AB. Disease-toxicant screen reveals a neuroprotective interaction between Huntington's disease and manganese exposure. *J Neurochem* 2010;112:227-237.

Monika Szeliga

Warszawa, 31.08.2016