

INSTYTUT MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ
IM. M. MOSSAKOWSKIEGO, POLSKA AKADEMIA NAUK

ZAKŁAD NEUROTOKSYKOLOGII

MARTA SIDORYK

**EKSPRESJA I FUNKCJE TRANSPORTERÓW GLUTAMINY
W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH POCHODZENIA
GLEJOWEGO**

**Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
Prof. dr hab. Jana Albrechta**



25 247

44085

WARSZAWA 2007

Pragnę złożyć szczególne podziękowania mojemu Promotorowi, Panu Prof. dr hab. Janowi Albrechtowi za myśl twórczą, która nadała charakter niniejszej pracy, a także za opiekę naukową, inspirację oraz za okazaną serdeczność i pomoc.

Marta Sidoryk

Praca ta nie powstałaby bez pomocy doc. Ewy Matyi, której jestem wdzięczna za precyzyjną ocenę histopatologiczną materiału badawczego oraz za pomoc w przeprowadzeniu badań immunohistochemicznych udokumentowanych w postaci zdjęć umieszczonych w tej rozprawie, a także za cenne wskazówki podczas pisania pracy.

Ogromnie dziękuję mgr Marcie Obarze za wielkie zaangażowanie w badania nad regulacją pH.

Serdeczne podziękowania składam mgr Annie Dybel, Małgorzacie Bogacińskiej – Karaś, Mirosławie Poławskiej oraz mgr Marzenie Łazarczyk za pomoc przy przeprowadzaniu doświadczalnej części pracy.

Bardzo dziękuję dr Magdalenie Zielińskiej za podzielenie się wiedzą i doświadczeniem naukowym.

Serdecznie dziękuję mgr Agnieszce Konopackiej za inspirujące dyskusje oraz okazaną mi życzliwość i wyrozumiałość.

Pragnę podziękować dr Jackowi Jaworskiemu za wprowadzenie w metodykę i udostępnienie sprzętu laboratoryjnego.

Słowa podziękowania kieruję również w stronę moich Najbliższych oraz Przyjaciół za dodawanie mi otuchy, okazaną wyrozumiałość i wsparcie.

Marta

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

M. Sidoryk, E. Matyja, A. Dybel, M. Zielińska, J. Bogucki, D. J. Jaskólski, P. P. Liberski, P. Kowalczyk, J. Albrecht. Increased expression of a glutamine transporter SNAT3 is a marker of malignant gliomas, *Neuroreport* 15: 575-578, 2004.

Q. Wu, **M. Sidoryk**, M. Zielińska, J. Albrecht, M. Aschner. Acrylamide stimulates glutamine uptake in Fischer 344 rat astrocytes by a mechanism involving upregulation of the amino acid transport system N, *Ann. NY Acad. Sci.* 1053: 435-443, 2005.

M. Sidoryk, M. Obara, J. Albrecht. Selective decrease of SN1 (SNAT3) mRNA expression in human and rat glioma cells adapted to grow in acidic medium, *Neurochem. Int.* 48: 547-552, 2006.

Badania, których wyniki przedstawiono w tej pracy były częściowo finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach promotorskiego projektu badawczego nr 2 P05A12230.

I. WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY	5
II. WSTĘP	9
II. 1. Rola glutaminy w ośrodkowym układzie nerwowym	9
II. 2. Transport Gln w OUN	11
II. 2.1. Klasyfikacja układów transportujących aminokwasy preferujących Gln jako substrat	11
II. 2.2. Charakterystyka układów transportujących Gln w OUN	12
II. 2.2.1. Układ A	12
II. 2.2.2. Układ N	15
II. 2.2.3. Układ ASC	17
II. 2.2.4. Układ L	18
II. 3. Nowotwory wywodzące się z komórek glejowych	20
II. 3.1. Klasyfikacja	20
II. 3.2. Cechy glejaków na poziomie transdukcji sygnału wewnątrzkomórkowego	21
II. 3.3. Najistotniejsze zmiany na poziomie ekspresji genów	22
II. 3.4. Inwazyjność glejaków: rola układu glutamatergicznego i kanałów jonowych	24
II. 3.5. Glejaki a regulacja pH	26
II. 4. Rola Gln jako czynnika antyapoptotycznego	27
II. 5. Miejsce Gln w procesach związanych z nowotworzeniem	28
II. 5.1. Metabolizm Gln	28
II. 5.2. Transport Gln w nowotworach	29
II. 6. ASCT2 i LAT1 a nowotworzenie: integracja funkcji	30
III. CEL PRACY	33
IV. MATERIAŁY I METODY	35
IV. 1. Materiał biopsyjny nowotworów mózgu	35

IV. 2. Hodowle komórkowe	35
IV. 2.1. Hodowle pierwotne astrocytów	35
IV. 2.2. Hodowle pierwotne wyprowadzone z <i>glioblastoma multiforme</i> i <i>astrocytoma anaplasticum</i>	36
IV. 2.3. Hodowle linii glejaków C6 i T98G	36
IV. 3. Badania histopatologiczne i immunohistochemiczne	37
IV. 4. Warunki hodowania komórek w medium o zmienionym pH	38
IV. 5. Badanie żywotności komórek - test MTT	38
IV. 6. Analiza namnażania komórek	39
IV. 7. Badanie proliferacji komórek	39
IV. 8. Detekcja apoptozy	39
IV. 9. Pomiar wewnątrzkomórkowego pH	39
IV. 10. Analiza RT-PCR	40
IV. 10.1. Izolacja RNA	40
IV. 10.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji	41
IV. 10.3. Reakcja PCR	41
IV. 10.4. Elektroforeza	43
IV. 10.5. Sekwencjonowanie	44
IV. 11. Badanie stabilności mRNA kodującego SNAT3 w warunkach obniżonego pH	44
IV. 12. Warunki stosowania czynników egzogennych	44
IV. 12.1. Działanie inhibitora wymiennika Na^+/H^+ (HOE642) na komórki	44
IV. 12.2. Działanie akrylamidu na komórki	45
IV. 12.3. Działanie inhibitora kinazy PI3K (LY294002) na komórki	45
IV. 13. Wychwył glutaminy przez komórki przy udziale poszczególnych układów	45
IV. 14. Oznaczanie białka	46
IV. 15. Wyciszanie genu transportera SNAT3	46
IV. 15.1. Klonowanie siRNA do plazmidu pSUPER	46
IV. 15.2. Szczep bakteryjny i transformacja	47
IV. 15.3. Izolacja DNA plazmidowego i analiza klonów	47
IV. 15.4. Transfekcja linii glejaka T98G plazmidami rekombinowanymi	48
IV. 16. Statystyczne opracowanie wyników	49

V. WYNIKI	50
V. 1. Własności histologiczne i immunohistochemiczne <i>glioblastoma multiforme</i> (diagnostyka)	50
V. 2. Własności immunocytochemiczne hodowli pierwotnych wyprowadzonych z GBM i AA	51
V. 3. Ekspresja mRNA genów kodujących białka transportujące Gln: SNAT3, SNAT5, ASCT2, SNAT1	53
V. 4. Immunohistochemia SNAT3 w GBM	57
V. 5. Wpływ obniżenia pH medium hodowlanego na różne własności komórek	58
V. 5.1. Żywotność komórek linii glejaków C6, T98G oraz hodowli pierwotnej astrocytów	58
V. 5.2. Pomiar wewnątrzkomórkowego pH (pHi) komórek linii glejaków C6, T98G oraz hodowli pierwotnej astrocytów	59
V. 5.3. Ekspresja mRNA genów kodujących białka transportujące Gln: SNAT3, SNAT5, ASCT2, SNAT1 po obniżeniu pH medium hodowlanego komórek linii glejaków C6, T98G oraz hodowli pierwotnej astrocytów	60
V. 5.4. Ocena stabilności mRNA genu kodującego SNAT3 w linii glejaka C6	64
V. 5.5. Wychwył Gln przez komórki linii glejaków C6, T98G oraz hodowli pierwotnej astrocytów	66
V. 6. Pomiar wewnątrzkomórkowego pH (pHi) po farmakologicznym zahamowaniu wymiennika Na⁺/H⁺ w pożywce standardowej i w medium o obniżonym pH w linii glejaka T98G i hodowli pierwotnej astrocytów	69
V. 7. Analiza ekspresji mRNA kodującego SNAT3 po farmakologicznym zahamowaniu wymiennika Na⁺/H⁺ w pożywce standardowej i w medium o obniżonym pH w linii glejaka C6 i glejaka T98G	70
V. 8. Własności komórek linii glejaka T98G po transfekcji plazmidem z wklonowaną sekwencją skierowana przeciwko SNAT3	72
V. 8.1. Ekspresja mRNA kodującego SNAT3	72
V. 8.2. Barwienie immunocytochemiczne na obecność transportera SNAT3	72
V. 8.3. Wychwył Gln przez komórki	73
V. 8.4. Liczba komórek	74
V. 8.5. Indeks proliferacji	75

V. 9. Ekspresja mRNA genu kodującego białko transporterowe SNAT3 w warunkach inkubacji z karcynogenem (akrylamid) w hodowli pierwotnej astrocytów	76
V. 10. Wpływ zahamowania aktywności PI3K na żywotność komórek linii glejaka T98G	77
V. 11. Ekspresja mRNA genów kodujących białka transportujące Gln: SNAT3, ASCT2 oraz SNAT1 po inkubacji z inhibitorem PI3K w linii glejaka T98G	79
VI. DYSKUSJA	80
VI. 1. Ekspresja mRNA genów kodujących białka transportujące Gln w glejakiach o najwyższym stopniu złośliwości, przerzutach do układu nerwowego nowotworów narządów obwodowych oraz w hodowlach pierwotnych wyprowadzonych z glejaków	80
VI. 2. Rola SNAT3 w metabolizmie komórek glejaka	82
VI. 2.1. Ekspresja SNAT3 po obniżeniu pH środowiska oraz po zahamowaniu wymiennika Na^+/H^+: czy transporter ten pełni rolę w regulacji pH?	82
VI. 2.2. Transport Gln w warunkach obojętnego i obniżonego pH oraz po wyciszeniu ekspresji transportera SNAT3 metodą siRNA	84
VI. 3. Mechanizm odpowiedzialny za spadek ekspresji mRNA dla SNAT3	85
VI. 4. Wpływ wyciszenia mRNA genu kodującego SNAT3 na proces namnażania i indeks proliferacji komórek linii glejaka T98G	88
VI. 5. Ekspresja mRNA dla SNAT3 a szlak sygnałowy inicjowany przez PI3K w komórkach linii glejaka T98G	89
VI. 6. Przewidywane dalsze kierunki badań	90
VII. WNIOSKI	91
VIII. STRESZCZENIE	93
IX. LITERATURA	97

I. WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

A	układ transportujący aminokwasy (od „alanine”)
a	adenina
AA	gwiazdziak anaplastyczny (<i>astrocytoma anaplasticum</i>)
Akt (PKB)	kinaza serynowo-treoninowa (kinaza białkowa B – ang. <i>protein kinase B</i>)
Ala	alanina
AMPA	kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy (ang. <i>α-amino-3-hydroksy-5-methyl-4-isoxazole-propionate</i>),
Arg	arginina
ASC	układ transportujący aminokwasy (od „alanine, serine, cysteine”)
ASCT1	transporter aminokwasów układu ASC
ASCT2	transporter aminokwasów układu ASC
Asn	asparagina
ATCC	bank hodowli komórkowej (ang. <i>American Type Culture Collection</i>)
AURE	sekwencja RNA bogata w uracyl i adeninę (ang. <i>AU-rich element</i>)
BCECF AM	ester acetometylowy 2',7'-(bis-[2-karboksyetylo])- [5-6-karboksyfluoresceiny] (ang. 2',7'-(bis-[2-carboxyethyl])- [5-6-carboxyfluorescein] acetomethyl ester)
BCH	kwas 2-aminobicyklokarboksylowy (ang. 2-aminobicyclo[2,2,1]heptane-2-carboxylic acid)
c	cytozyna
C6	linia komórek glejaka szczurzego
cDNA	komplementarny DNA (ang. <i>complementary DNA</i>)
ζ -cryst/Nqr	ζ -krystalina / reduktaza NADPH:chinonu (ang. <i>ζ-crystallin / NADPH: quinone reductase</i>)
Cys	cysteina
CySS	cystyna
DEPC	dwuetylopirowęglan (ang. <i>diethylpyrocarbonate</i>)
DMEM	pożywka do hodowli komórkowych (ang. <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	trójfosforan deoksyrybonukleozydu (ang. <i>deoxyribonucleoside triphosphate</i>)
DRB	5-6-dichloro-1- β -rybofuranozylobenzoimidazol (ang. 5-6-dichloro-1- β -ribofuranosylbenzimidazole)
DTT	ditiotretiol (ang. <i>dithiotretiol</i>), stabilizator wiązań S-H
EAAT-1	transporter Glu, inaczej nazywany GLAST (ang. <i>excitatory amino acid transporter -1</i>)
EAAT-2	transporter Glu, inaczej nazywany GLT (ang. <i>excitatory amino acid transporter -2</i>)

EC	międzynarodowa klasyfikacja enzymów (ang. <i>Enzyme Commission</i>)
EDTA	kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EGF	nabłonkowy czynnik wzrostu (ang. <i>epidermal growth factor</i>)
EGFR	receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (ang. <i>epidermal growth factor receptor</i>)
F	starter komplementarny używany w reakcji PCR (ang. <i>forward</i>)
FBS	płodowa surowica bydłęca (ang. <i>fetal bovine serum</i>)
g	guanina
GABA	kwas γ -aminomasłowy (ang. <i>gammaaminobutyric acid</i>)
GAPDH	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (ang. <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>)
GBM	glejak wielopostaciowy (<i>glioblastoma multiforme</i>)
GFAP	glejowe kwaśne białko włókienkowe (ang. <i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GLAST	transporter Glu, inaczej nazywany EAAT-2
Gln	glutamina
GLT	transporter Glu, inaczej nazywany EAAT-2
Glu	kwas glutaminowy
Gly	glicyna
GS	syntetaza glutaminy (ang. <i>glutamine synthetase</i>)
GSH	glutation (forma zredukowana)
H2.35	linia wyprowadzona z raka wątroby u człowieka
HeLa	linia wyprowadzona z komórek nabłonkowych pochodzących z raka szyjki macicy człowieka
HEPES	kwas N-2-hydroksy piperazyno-N-2-etanosulfonowy (ang. <i>N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]</i>)
HepG2	linia wyprowadzona z raka wątroby człowieka
His	histydyna
HOE642	„cariporid”, inhibitor wymiennika Na^+/H^+
HSP 70	białko szoku cieplnego 70 (ang. <i>heat shock protein 70</i>)
HuR	białko należącego do rodziny białek wiążących się z RNA
kb	kilozasada (ang. <i>kilobase</i>)
LAT1	transporter aminokwasów układu L (ang. <i>L-type amino acid transporter</i>)
LAT2	transporter aminokwasów układu L (ang. <i>L-type amino acid transporter</i>)
Leu	leucyna
LY294002	2-(4-morfolinyl)-8-fenyl-4H-1-benzopirany-4-on
Ki-67	białko obecne w jądrach komórek aktywnych mitotycznie
K_m	stała Michaelisa
MeAIB	kwas N-metyloaminoizomasłowy (ang. <i>2-(methylamino)isobutyric acid</i>)
MK801	melainian dizocyliny
mRNA	informacyjny RNA (ang. <i>messenger RNA</i>)
mTOR	wrażliwa na rapamycynę kinaza serynowo-treoninowa (ang. <i>mammalian Target of Rapamycin</i>)

MTT	bromek 3-(4,5-dimetylo 2-tiazolylo)-2,5-difenylotetrazolowy (ang. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)
NCBI	serwer danych biomedycznych (ang. <i>National Center for Biotechnology Information</i>)
NMDA	N-metylo-D-asparaginian (ang. <i>N-methyl-D-aspartate</i>)
OD	gęstość optyczna (ang. <i>optical density</i>)
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PAG	glutaminaza aktywowana fosforanem (ang. <i>phosphate activated glutaminase</i>)
PARP	polimeraza poli(ADP-rybozy) (ang. <i>poly ADP-ribose polymerase</i>)
PBS	buforowana sól fizjologiczna (ang. <i>phosphate-buffered saline</i>)
pHe	pH zewnątrzkomórkowe (ang. <i>pH extracellular</i>)
pHi	pH wewnątrzkomórkowe (ang. <i>pH intracellular</i>)
pH-RE	element odpowiedzi na pH (ang. <i>pH-response element</i>)
PI3K	kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (ang. <i>phosphatidylinositol-3-kinase</i>)
PIP2	3,4-dwufosforan inozytolu (ang. <i>phosphatidylinositol 3,4-biphosphate</i>)
PIP3	3,4,5-trójfosforan inozytolu (ang. <i>phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate</i>)
Pro	prolina
PTEN	białko o właściwościach fosfatazy (ang. <i>phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10</i>)
pz	pary zasad
R	starter odwrotnie komplementarny używany w reakcji PCR (ang. <i>reverse</i>)
RNA	kwas rybonukleinowy (ang. <i>ribonucleic acid</i>)
RNAza	rybonukleaza
rpm	liczba obrotów na minutę (ang. <i>rotate per minute</i>)
RT	odwrotna transkryptaza (ang. <i>reverse transcriptase</i>)
RT-PCR	reakcja odwrotnej transkrypcji i łańcuchowa reakcja polimeryzacji (ang. <i>reverse transcriptase – polymerase chain reaction</i>)
SD	odchylenie standardowe (ang. <i>standard deviation</i>)
Ser	seryna
shRNA	RNA o strukturze spinki (ang. <i>short hairpin RNA</i>)
siRNA	małe interferujące RNA (ang. <i>small interfering RNA</i>)
SK-Hep	linia wyprowadzona z raka wątroby człowieka
SK-N-SH	linia wyprowadzona z nerwiaka zarodkowego człowieka
SNAT1	transporter aminokwasów układu A
SNAT3	transporter aminokwasów układu N
SNAT4	transporter aminokwasów układu N
SNAT5	transporter aminokwasów układu N
t	tymina
T24	linia wyprowadzona z raka pęcherza moczowego człowieka
T98G	linia komórek glejaka człowieka
TBE	tris-boran-EDTA (ang. <i>tris-borate-EDTA</i>), bufor do elektroforezy DNA

Thr	treonina
Tris	tri(hydroksymetylo)aminometan (ang. <i>tri</i> <i>[hydroxymethyl]aminomethane</i>)
TRIZol	odczynnik do izolacji RNA (ang. <i>Total RNA Isolation Reagent</i>)
u	uracyl
U-87	linia wyprowadzona z glejaka wielopostaciowego człowieka
3' UTR	region mRNA nieulegający translacji (ang. <i>3' untranslated</i> <i>region</i>)
Val	walina
V _{max}	maksymalna prędkość reakcji

II. WSTĘP

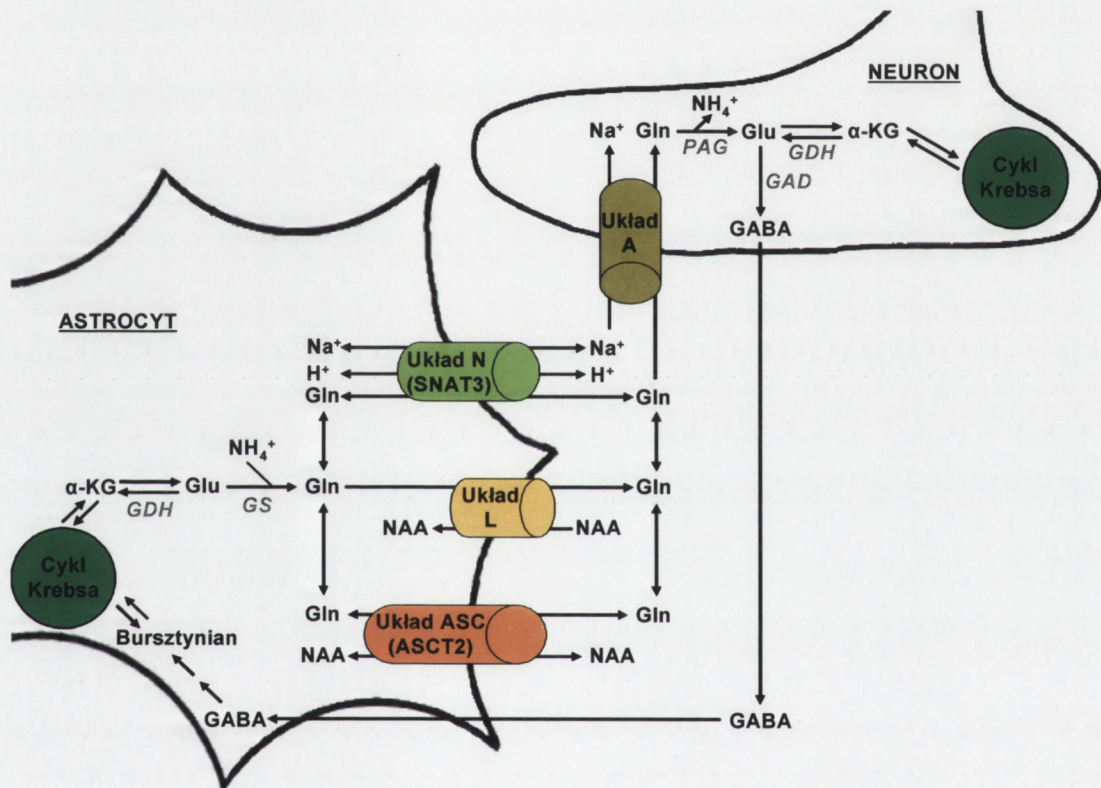
II. 1. Rola glutaminy w ośrodkowym układzie nerwowym

Glutamina (Gln) występuje w wysokim stężeniu w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). Jej zawartość znacząco przewyższa stężenie innych aminokwasów w płynie mózgowo-rdzeniowym i w przestrzeni zewnątrzkomórkowej w mózgu [McGale i wsp., 1977; Hamberger i Nyström, 1984]. Stężenie Gln mierzonej w homogenatach mózgu waha się w granicach 6-11 mM [Erecińska i Silver, 1990], przy nieznaczących różnicach regionalnych [Zanchin i wsp., 1979]. Zewnątrzkomórkowe stężenie Gln, mierzone w mikrodializatach różnych okolic mózgu wynosi od 0,13 mM do 0,5 mM, natomiast w przypadku innych aminokwasów są to wartości mikromolarne [Jacobson i wsp., 1985; Bröer i Brookes, 2001]. Stężenie Gln w płynie mózgowo-rdzeniowym jest bliskie 0,5 mM i przybiera wartości 10-100-krotnie wyższe w porównaniu z innymi aminokwasami [Xu i wsp., 1998].

Glutamina jest metabolitem zaangażowanym w wiele procesów komórkowych swoistych dla OUN takich jak metabolizm amoniaku oraz synteza neuroprzekaźników aminokwasowych. Wobec braku w OUN pełnego cyklu mocznikowego, amoniak neutralizowany jest na drodze amidacji kwasu glutaminowego (Glu) do Gln. Reakcja ta odbywa się wyłącznie w astrocytach, w reakcji katalizowanej przez syntetazę glutaminową (GS, EC 6.3.1.2) [Martinez-Hernandez i wsp., 1977; Norenberg, 1979; Norenberg i Martinez-Hernandez, 1979]. Nowosynteżowana Gln uwalniana jest z astrocytów a następnie transportowana do zakończeń nerwowych [Waniewski i Martin, 1986]. W wyniku hydrolizy z udziałem aktywowanej fosforanem glutaminazy (PAG, EC 3.5.1.2), preferencyjnie zlokalizowanej w zakończeniach nerwowych [Schousboe i wsp., 1979; Laake i wsp., 1999], z Gln powstaje neuroprzekaźnik pobudzający - Glu [Hamberger i wsp., 1979]. Z kolei dekarboksylacja Glu prowadzi do tworzenia się neuroprzekaźnika hamującego - kwasu γ -aminomasłowego (GABA) [Paulsen i wsp., 1988; Sonnewald i wsp., 1993].

Poza rolami swoistymi dla OUN, Gln bierze udział w metabolizmie energetycznym komórek. Powstający z glutaminy Glu ulega deaminacji do α -ketoglutaranu - metabolitu pośredniego w cyklu Krebsa. Szczegółowe dane na temat udziału Gln w przemianach energetycznych podsumowano w kilku artykułach przeglądowych [Hall i wsp, 1996; Daikhin i Yudkoff 2000; Bak i wsp., 2006; Albrecht i wsp., 2007] (Ryc. II.1).

Ryc. II.1. Metabolizm Gln na szlaku Glu - Gln w OUN. Udział układów transportujących Gln



Synteza Gln odbywa się w astrocytach w reakcji amidacji Glu katalizowanej przez GS - syntetazę glutaminianową. Glutamina jest transportowana na zewnątrz astrocytów za pośrednictwem transporterów należących do układów: N, ASC, L. W przypadku transportera układu N - SNAT3 transport Gln związany jest z wymianą jonu Na⁺ na H⁺. Układy ASC i L transportują Gln na zasadzie wymiany z aminokwasami neutralnymi (NAA). Zewnątrzkomórkowa Gln pobierana jest przez neurony za pośrednictwem transporterów należących do układu A. W astrocytach Gln ulega hydrolizie do Glu w reakcji katalizowanej przez PAG - glutaminazę aktywowaną fosforanem. Dekarboksylacja Glu przez GAD - dekarboksylazę glutaminianową jest źródłem neuroprzebieżnika hamującego - GABA, zaś w wyniku deaminacji przez GDH - dehydrogenazę glutaminianową powstaje α -KG (α -ketoglutaran), który następnie włączany jest do cyklu Krebsa.

II. 2. Transport Gln w OUN

II. 2.1. Klasyfikacja układów transportujących aminokwasy preferujących Gln jako substrat

Pierwszych doniesień dotyczących funkcjonalnej charakterystyki układów transportujących aminokwasy dostarczyła grupa Christensena w latach 60, wykorzystująca do swych badań znakowane aminokwasy, bądź ich analogi. Prace prowadzono na komórkach guza wysiękowego Ehrlicha myszy i erytrocytach [Oxender i Christensen, 1963; Christensen i Liang, 1965; Christensen i wsp., 1965; Christensen, 1990].

Układy transportujące aminokwasy klasyfikuje się na bazie ich swoistości substratowej, zależności od pH, składu jonowego środowiska, kinetyki transportu, czy wreszcie regulacji przez czynniki zewnętrzne, takie jak właściwe określonym tkankom enzymy i hormony. Nazwy poszczególnych układów biorą się z ich swoistości substratowej [Oxender i Christensen, 1963]. Pierwotnym kryterium podziału transporterów jest ich zależność od jonów sodu. W przypadku układów sodozależnych elektrochemiczny międzybłonowy gradient Na^+ , utrzymywany przy udziale Na^+/K^+ -ATP-azy, umożliwia transport aminokwasów wbrew ich gradientowi stężeń. Ponadto wyróżnia się układy sodoniezależne, katalizujące transport wymienny aminokwasów. W transporcie Gln przez błony komórkowe OUN uczestniczą przede wszystkim układy zależne od Na^+ , takie jak: A, ASC, N oraz niezależny od Na^+ układ L (**Ryc. II.1; Tabela II.1**).

W ostatnich latach sklonowano dużą liczbę genów kodujących białka uczestniczące w transporcie Gln u ssaków. Technika klonowania pozwoliła na zbadanie molekularnej natury białek transportujących aminokwasy. Co do nazw poszczególnych transporterów zdania wśród badaczy są podzielone. W niniejszym wstępie skupiono uwagę na charakterystyce transporterów najbardziej swoistych dla glutaminy, należących do układów ASC, N, A oraz L (**Tabela II.2**).

Tabela II.1. Ogólna charakterystyka układów transportujących Gln w OUN

Cechy transportu	Układ (przedstawiciel)			
	A (SNAT1)	ASC (ASCT2)	N (SNAT3; SNAT5)	L (LAT1)
Na ⁺ zależność	+	+	+	-
pH zależność	+	-	+	-
Li ⁺ wrażliwość	+/-	-	+	-
Substraty inne niż Gln	Ala, Ser, Pro, Gly, MeAIB	Ala, Cys, Ser, Thr	Ala, Thr, Cys, Ser,	Leu, Phe, Ile, BCH

+/- brak zgodności wśród badaczy, wg Christensen [1990].

II. 2.2. Charakterystyka układów transportujących Gln w OUN

II. 2.2.1. Układ A

Układ A jest jednym z najwcześniej opisanych i najczęściej występujących układów transportujących aminokwasy [Oxender i Christensen, 1963]. Układ ten cechuje zależność od jonów sodu oraz spadek aktywności przy niskim pH. Przedmiotem sporów wśród badaczy pozostaje tolerancja na zastąpienie Na⁺ przez Li⁺. Stechiometria transportu aminokwasów i sodu wynosi 1:1. Transport aminokwasów odbywa się do wnętrza komórki. Poza Gln układ ten wykazuje powinowactwo do krótkich obojętnych aminokwasów, takich jak alanina (Ala), seryna (Ser), prolina (Pro) i glicyna (Gly). Unikalną cechą układu A jest zdolność do transportu N-metylowanych aminokwasów, których modelowym przedstawicielem jest kwas N-metyloizomasłowy (MeAIB) [Christensen i wsp., 1965]. Cechą wyróżniającą ten układ spośród innych jest jego modulacja przez dużą liczbę czynników środowiskowych. Aktywność adaptacyjną układu A objawiającą się wzmożoną ekspresją mRNA notowano w warunkach niedoboru aminokwasów w medium hodowlanym m.in. w linii wątrobiaka (HepG2), linii glejaka szczurzego (C6) oraz fibroblastach człowieka [Gazzola i wsp., 2001; Ling i wsp., 2001; Bain i wsp., 2002]. Aktywność układu A stymulowana jest przez hormony, takie jak

insulina i glukagon oraz nabłonkowy czynnik wzrostu EGF (ang. *epidermal growth factor*) [Kilberg, 1986; Moule i McGivan, 1987; McGivan i Pastor-Anglada, 1994].

Tabela II.2. Ostatnio sklonowane białka transportujące aminokwasy należące do układów: ASC, N, A, L

Transporter	gatunek	Dane literaturowe
układ ASC		
ASCT2	mysz	Utsunomiya-Tate i wsp., 1996
ASCT2	człowiek	Kekuda i wsp., 1996
ASCT2	królik	Kekuda i wsp., 1997
ASTC2	szczur	Bröer i wsp., 1999
układ N		
SNAT3*(SN1)	szczur	Chaudhry i wsp., 1999
SNAT3(SN1)	mysz	Gu i wsp., 2000
SNAT3(SN1)	człowiek	Fei i wsp., 2000
SNAT5(SN2)	człowiek	Nakanishi i wsp., 2001 a
układ A		
SNAT1(ATA1)	szczur	Varoqui i wsp., 2000
SNAT2(ATA2)	szczur	Yao i wsp., 2000
SNAT2(ATA2)	człowiek	Hatanaka i wsp., 2000
układ L		
LAT1	szczur	Kanai i wsp., 1998
LAT1	człowiek	Prasad i wsp., 1999
LAT2	szczur	Segawa i wsp., 1999
LAT2	człowiek	Pineda i wsp., 1999

* nomenklatura wg Mackenzie i Erickson [2004].

W 2000 roku wyizolowano z hodowli neuronów glutamatergicznych szczura transporter należący do układu A - SNAT1, inaczej nazywany GlnT, SA2 lub ATA1 [Varoqui i wsp., 2000; Chaudhry i wsp., 2002; Mackenzie i Erickson, 2004]. Wang i wsp. [2000] wyizolowali *SNAT1* z łożyska człowieka. Gen kodujący ten transporter zlokalizowany jest na chromosomie 12 w regionie q12-q13.11 i ma wielkość około 9,0 kb. Produkt tego genu złożony jest z 487 aminokwasów, w 93% wykazuje homologię, a w 95% identyczność z transporterem SNAT1 szczura. Hybrydyzacja *in situ* wykazała silną ekspresję tego wariantu w mózgu i w rdzeniu kręgowym szczura [Varoqui i wsp., 2000]. SNAT1 odpowiedzialny jest za wychwyt Gln przez neurony, a zatem za uzupełnianie neuroprzebieżnikowej puli Glu i GABA. Ekspresję SNAT1 na poziomie mRNA i białka zaobserwowano w neuronach glutamatergicznych oraz GABAergicznym zarówno *in situ*, jak i w hodowli [Armano i wsp., 2002; Chaudhry i wsp., 2002]. Ponadto ekspresję tego transportera notuje się w neuronach dopaminergicznym substancji szarej i motoneuronach cholinergicznym oraz po wewnętrznej stronie błony komórek śródbłónka naczyń. Istnieją przesłanki, że transporter ten odgrywa istotną rolę w uzupełnianiu puli Gln uczestniczącej w syntezie glutationu (GSH) [Mackenzie i wsp., 2003].

Innym przedstawicielem systemu A jest SNAT2, inaczej nazywany ATA2, SAT2 lub SA1 [Reimer i wsp., 2000; Sugawara i wsp., 2000; Yao i wsp., 2000; Mackenzie i Erickson, 2004]. W OUN transporter ten wyizolowano z hodowli szczurzych neuronów glutamatergicznych. Izoforma ta preferencyjnie rozpoznaje prolinę. Analiza Northern blot wykazała najwyższą ekspresję mRNA kodującego SNAT2 w mózgu, rdzeniu kręgowym, nerce, okrężnicy, nadnerczach i jej brak w jądrze i wątrobie. Ekspresję tego transportera z wykorzystaniem hybrydyzacji *in situ* notowano w neuronach glutamatergicznych mózgu oraz motoneuronach rdzenia kręgowego szczura [Yao i wsp., 2000]. Silną ekspresję tego transportera notowano w komórkach śródbłónka naczyń mózgu tworzących barierę krew - mózg [Takanaga i wsp., 2002]. Hatanaka i wsp. [2000] wyizolowali *SNAT2* z ludzkiej linii wątrobiaka (HepG2). Gen kodujący ten transporter zlokalizowany jest na ramieniu długim chromosomu 12. Produkt tego genu złożony jest z 506 aminokwasów i wykazuje w 88% identyczność i w 93% homologię sekwencji aminokwasowej z omawianym szczurzym wariantem. Ekspresję *SNAT2* zaobserwowano we wszystkich badanych narządach, w tym w mózgu, wątrobie, sercu, nerce, okrężnicy, płucach, mięśniach, śledzionie, jądrze i łożysku [Hatanaka i wsp., 2000; Wang i wsp., 2000].

II. 2.2.2. Układ N

Układ N został opisany po raz pierwszy przez grupę Kilberga w latach 80, jako najbardziej swoisty dla Gln. Charakteryzuje go wysoka swoistość substratowa, oparta na rozpoznawaniu aminokwasów z azotem w łańcuchu bocznym, a zatem obok Gln – wyłącznie histydyny (His) i asparaginy (Asn). Inną cechą omawianego układu jest sodozależność, wzrost aktywności wraz ze wzrostem pH [Kilberg i wsp., 1980]. Układ ten opisano w hepatocytach [Bode i wsp., 1990], a także w mięśniach [Rennie i wsp., 1986; Hundal i wsp., 1987] i hodowli pierwotnej neuronów szczura [Tamarappoo i wsp., 1997].

W roku 1999 po raz pierwszy wyizolowano z mózgu szczura gen kodujący transporter należący do tego układu N - SNAT3, znany również jako SN1 [Chaudhry i wsp., 1999]. W tym samym czasie sklonowano inny wariant układu N z nerki myszy - transporter NAT, znany również jako SNAT4 [Gu i wsp., 2000]. W następnej kolejności wyizolowano i scharakteryzowano wariant z linii wątrobiaka (HepG2) człowieka. Gen kodujący SNAT3 zlokalizowany jest na chromosomie 3 w regionie p21.3 i zbudowany jest z 16 eksonów oraz 15 intronów, które mają wielkość około 16 kb [Fei i wsp., 2000].

SNAT3 we wszystkich badanych organizmach jest białkiem złożonym z 504 aminokwasów i wykazuje silną homologię międzygatunkową. W przypadku myszy i człowieka stwierdza się 89% identyczność, a w przypadku szczura i człowieka sięga ona 90% [Chaudhry i wsp., 1999; Fei i wsp., 2000; Gu i wsp., 2000]. Transporter ten wykazuje dużą zbieżność na poziomie aminokwasowym i czynnościowym z transporterem układu A - SNAT1. Cechą odróżniającą SNAT3 od SNAT1 jest transport Gln związany z wymianą jonu Na^+ na H^+ w przypadku tego pierwszego, a zatem jego elektrobojętność [Chaudhry i wsp., 2002]. Ekspresję mRNA kodującego SNAT3 u ssaków notowano w mózgu, wątrobie, mięśniach szkieletowych, sercu, nerce. Nie wykazano białka SNAT3 w sercu i mięśniach [Boulland i wsp., 2002]. W mózgu SNAT3 nie ulega ekspresji w neuronach, zaś występuje obficie w astrocytach przylegających do neuronów GABAergicznym i glutamatergicznym. Analiza immunohistochemiczna OUN szczura wykazała najwyższe stężenie transportera w rdzeniu przedłużonym i opuszce węchowej, a najniższe w prążkowie, siatkówce i rdzeniu kręgowym [Boulland i wsp., 2002]. Badania immunocytochemiczne wskazują na wysokie stężenie i szybką syntezę tego transportera we wczesnych

etapach rozwojowych szczura [Boulland i wsp., 2003]. Zbieżność tego zjawiska ze wzrostem stężenia kwasu glutaminowego i GABA w OUN oraz procesem synaptogenezy wskazują, że ekspresja ta jest silnie regulowana przez te neuroprzekaźniki aminokwasowe. Ponadto ekspresja SNAT3 koreluje ze wzrostem zapotrzebowania na glutaminę w trakcie rozwoju OUN.

SNAT3 pośredniczy w transporcie Gln w obu kierunkach: na zewnątrz i do wnętrza komórki [Chaudhry i wsp., 1999]. Bröer i wsp. [2002] wykazali, że w oocytach *Xenopus laevis* transfekowanych genem tego transportera, transport za pośrednictwem SNAT3 zależny jest od wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Na^+ oraz od zewnątrzkomórkowego pH i jest elektrobojętny. Obserwowano, że wzrost transportu glutaminy koreluje ze wzrostem pH na zewnątrz komórki. W zgodzie z aktywnością jonowymienną SNAT3, badania na oocytach transfekowanych tym transporterem, a także w hodowli pierwotnej astrocytów szczura wykazały, że transport Gln do wnętrza tych komórek zwiększa ich wewnątrzkomórkowe pH [Chaudhry i wsp., 2001]. Istnieje kilka doniesień przemawiających za tym, że w nerce układ N uczestniczy w regulacji pH. Niedawno Karinch i wsp. [2002] wykazali nadekspresję mRNA kodującego SNAT3 w nerce w warunkach długotrwałego zakwaszenia. Nowsza praca przyniosła dodatkowe dowody wskazujące na szczególną rolę, jaką odgrywa SNAT3 w kwasicy nerkowej. Solbu i wsp. [2005] wiążą wzrost aktywności układu N w warunkach zakwaszenia z występowaniem w 3'UTR (ang. *3' untranslated region*) mRNA kodującego SNAT3 region bogaty w uracyl i adeninę – AURE (ang. *AU-rich element*). Jest to analogiczne do występowania podobnej sekwencji w regionie 3'UTR mRNA kodującego PAG [Laterza i Curthoys, 2000]. W tym ostatnim przypadku sugerowano mechanizm wzrostu okresu półtrwania i stabilności mRNA kodującego PAG polegający na zwiększeniu powinowactwa białka ζ -cryst/Nqr (ζ -kryształina/reduktaza NADPH:chinonu) do AURE w warunkach kwasicy metabolicznej [Curthoys i Gstraunthaler, 2001].

W 2001 roku sklonowano z ludzkiej linii wątrobiaka (HepG2) kolejny wariant omawianego układu - SNAT5, inaczej określany jako SN2 [Nakanishi i wsp., 2001 a]. Analiza Northern blot wykazała jego ekspresję we wszystkich badanych narządach. W mózgu, płucach, okrężnicy, jelicie, śledzionie notowano transkrypt wielkości 2,2 kb, w nerce 2 kb, w żołądku 1,4 kb. Zaobserwowane różnice w wielkości transkryptu, sugerują alternatywne składanie mRNA (ang. *alternative*

splicing) kodującego SNAT5. Ta sama grupa sklonowała również SNAT5 z mózgu szczura. Gen kodujący ten transporter zlokalizowany jest na chromosomie 10 w regionie p11.23, a jego produkt jest białkiem zbudowanym z 471 aminokwasów i wykazuje 63% identyczność sekwencji aminokwasowej ze SNAT3 oraz 50 - 60% homologię z przedstawicielami układu A. Transport z udziałem SNAT5 ma charakter elektrogeny, Na^+ -zależny, toleruje zastąpienie Na^+ przez Li^+ i jest wrażliwy na pH. Transporter ten wykazuje znacznie szerszą specyficzność substratową niż SNAT3. Wariant ten poza Gln i His rozpoznaje Ala, Ser, Pro, Gly [Nakanishi i wsp., 2001 b]. SNAT5 podobnie jak SNAT3 uczestniczy w cyklu przemian Gln - Glu w mózgu. Wykazano jego silną ekspresję w wielu badanych okolicach mózgu, takich jak hipokamp, prążkowie, rdzeń kręgowy, kora a także słabszą ekspresję w podwzgórz, wzgórz wzrokowym oraz w pniu mózgu [Cubelos i wsp., 2005].

Utworzona *in vivo* przez błony śródbłonna naczyń włosowatych bariera krew - mózg i śródbłonna splotów naczyń bariera krew - płyn - mózgowo - rdzeniowy stanowi fizyczne ograniczenie transportu cząsteczek nierozpuszczalnych w tłuszczach z krwi do mózgu. Z uwagi na intensywny metabolizm bariera bogata jest w białka transportujące niezbędne związki. Układ N uczestniczy w transporcie glutaminy przez barierę krew - mózg [Keep i Xiang, 1995; Ennis i wsp., 1998; Xiang i wsp., 1998]. Badania immunohistochemiczne wykazały obecność wariantu układu N - transportera SNAT3 w komórkach endotelialnych i epitelialnych mózgu szczura [Chaudhry i wsp., 1999, Boulland i wsp., 2003]. Xiang i wsp. [2003] wykazali transport Gln z udziałem układu N w izolowanych splotach naczyniówki oraz w hodowli pierwotnej splotów naczyniówki komórek śródbłonna naczyń szczura. Analiza RT-PCR wykazała obecność mRNA kodujących SNAT3 i SNAT5 w badanych strukturach.

II. 2.2.3. Układ ASC

Układ ASC wykazuje swoistość substratową w pierwszym rzędzie wobec Ala, Ser, cysteiny (Cys), stąd też jego nazwa. Cechą charakterystyczną tego układu jest znaczna specyficzność substratowa i transport poza wymienionymi aminokwasami także Gln, treoniny (Thr), czy też aminokwasów rozgałęzionych: leucyny (Leu), waliny (Val), metioniny (Met) [Christensen i wsp., 1965; Kekuda i wsp., 1996; Utsunomiya-Tate i wsp., 1996]. Transport aminokwasów przez układ

ASC zależny jest od jonów Na^+ , mało wrażliwy na pH i nie toleruje zastąpienia Na^+ przez Li^+ [Medina i wsp., 2001].

W roku 1993 po raz pierwszy sklonowano transporter ASCT1 z kory ruchowej i hipokampa człowieka [Arriza i wsp., 1993; Shafqat i wsp., 1993]. Izoforma ta wykazuje silne powinowactwo do Ala, Ser i Cys, w mniejszym stopniu do Thr i Val. ASCT1 nie transportuje Gln i Asn. Analiza Northern blot wykazała najsilniejszą ekspresję transportera w mózgu, mięśniach szkieletowych oraz łożysku [Arriza i wsp., 1993].

W 1996 roku wyizolowano z jądra myszy inny wariant układu ASC - ASCT2. Analiza Northern blot wykazała brak ekspresji tego wariantu w mózgu [Utsunomiya-Tate i wsp., 1996]. W tym samym czasie Kekuda i wsp. [1996] zidentyfikowali ASCT2 w komórkach kosmówczaka łożyska człowieka. Analiza Northern blot wykazała mRNA kodujące transkrypt wielkości 2,9 kb w łożysku, płucach, nerce, trzustce i mięśniach szkieletowych. Ta sama grupa badaczy sklonowała gen ASCT2 z jelita królika. Gen ten zlokalizowany jest na chromosomie 19 w regionie q13.3, a jego produktem jest białko złożone z 541 aminokwasów [Kekuda i wsp., 1997]. Bröer i wsp. [1999] sklonowali z hodowli pierwotnej astrocytów szczura gen kodujący ASCT2 – białko złożone z 539 aminokwasów. Wariant ten występuje zarówno w dorosłym, jak i embrionalnym mózgu szczura. ASCT2 pośredniczy w transporcie Gln z astrocytów na zasadzie wymiany z zewnątrzkomórkowymi aminokwasami obojętnymi i czynnie uczestniczy w cyklu Glu - Gln. Transporter ASCT2 szczura wykazuje 83% zbieżność na poziomie aminokwasowym z transporterem myszy i 76% z transporterem człowieka [Bröer i wsp., 1999]. Z kolei ASCT2 człowieka jest w 79% identyczny z wariantem mysim i w 85% z wariantem królika [Kekuda i wsp., 1997].

II. 2.2.4. Układ L

Układ L został po raz pierwszy opisany w komórkach guza wysiękowego Ehrlicha myszy i został tak określony z uwagi na silną swoistość względem Leu. [Oxender i Christensen, 1963]. Transport Gln z udziałem tego układu zaobserwowano zarówno w hodowli astrocytów, jak i neuronów [Nagaraja i Brookes, 1996; Heckel i wsp., 2003]. Cechą odróżniającą układ L od uprzednio omawianych jest jego niezależność od jonów Na^+ oraz hamowanie przez

niemetabolizowany analog aminokwasowy, kwas 2-aminobicyklokarboksylowy (BCH) [Christensen i Liang, 1965]. Znaczna specyficzność substratowa układu L pozwala na transport nie tylko naturalnie występujących w organizmie aminokwasów, ale również spokrewnionych z nimi związków, takich jak: L-DOPA, lek stosowany w chorobie Parkinsona, melfalan będący pochodną iperytu azotowego stosowany m.in. w szpiczaku mnogim, czy też hormony tarczycy: tyroksynę i trójjodotyroninę [Goldenberg i wsp., 1979; Christensen, 1990; Lakshmanan i wsp., 1990]. Greig i wsp. [1987] wykazali, że układ L odpowiedzialny jest za transport melfalanu przez barierę krew - mózg.

W 1998 wyizolowano z linii glejaka sznurczego C6 pierwszą izoformę układu L – LAT1, a także stwierdzono obecność tego transportera w mózgu, śledzionie i łożysku oraz w mniejszym stopniu w jądrze i okrzężnicy szczura [Kanai i wsp., 1998]. W 1999 sklonowano *LAT1* z łożyska człowieka i wykazano jego pokrewieństwo z LAT1 szczura. Transporter ten złożony jest z 507 aminokwasów. Analiza Northern blot wykazała wysoką ekspresję tego wariantu w mózgu, łożysku, mięśniach szkieletowych oraz niską w sercu, okrzężnicy, grasicy, śledzionie, nerce, płucach oraz leukocytach [Prasad i wsp., 1999].

Kolejny przedstawiciel układu L – LAT2 wyizolowany został z jądra szczura [Segawa i wsp., 1999]. Wariant ten dobrze opisano także u królika [Rajan i wsp., 1999; Rajan i wsp., 2000]. Gen kodujący LAT2 u człowieka zlokalizowano na chromosomie 14 w regionie q11.2-13, a jego produkt złożony jest z 535 aminokwasów. mRNA kodujący ten transporter występuje w najwyższym stężeniu w nerce, łożysku, mózgu i wątrobie. U człowieka LAT2 wykazuje 50% zbieżność aminokwasową z LAT1 [Pineda i wsp., 1999].

Zarówno wariant LAT1, jak i LAT2 składa się z 12 domen śródbłonowych, które katalizują niezależną od Na^+ wymianę aminokwasów [Kanai i wsp., 1998]. Warunkiem aktywacji LAT1 i LAT2 jest połączenie poprzez wiązanie dwusiarczkowe z ciężkim łańcuchem białka błonowego typu II 4F2 [Kanai i wsp., 1998; Segawa i wsp., 1999]. LAT2 występuje we wszystkich przebadanych narządach [Kanai i wsp., 1998]. Cechą różniącą obie izoformy jest ich swoistość substratowa - LAT2 wykazuje zdecydowanie silniejsze niż LAT1 powinowactwo do Gln [Segawa i wsp., 1999]. LAT1 preferuje rozgałęzione [Uchino i wsp., 2002], podczas gdy LAT2 akceptuje w równym stopniu rozgałęzione i nierozgałęzione aminokwasy [Pineda i wsp., 1999; Segawa i wsp., 1999]. LAT1 nie jest wrażliwy na

zmiany pH, zaś aktywność LAT2 jest wyższa przy niskim pH środowiska [Rajan i wsp., 2000]. Dużo miejsca poświęcono udziałowi układu L w transporcie Gln przez barierę krew – mózg [Hargreaves i Pardridge, 1988; Segawa i wsp., 1999]. Analiza Northern Blot wykazała 100-krotnie wyższą ekspresję LAT1 w naczyniach włosowatych mózgu bydłęcego niż w komórkach linii glejaka C6, czy niefrakcjonowanym mózgu szczura [Boado i wsp., 1999].

II. 3. Nowotwory wywodzące się z komórek glejowych

II. 3.1. Klasyfikacja

Nowotwory gleju (glejaki) stanowią grupę najczęściej występujących pierwotnych guzów OUN. Około 50% glejaków to odmiany o wysokim stopniu złośliwości. Do tej grupy należy głównie glejak wielopostaciowy (*glioblastoma multiforme*, GBM), o IV stopniu złośliwości histologicznej wg WHO [Kleihues i Cavenee, 2000]. GBM utworzony jest z komórek słabo zróżnicowanych. Glejaka tego cechuje różnorodność komórkowa, od form włóknkowych po wielojądrowe i pleomorficzne [Reifenberger i Collins, 2004]. GBM wykazuje atypię jądrową, proliferację mikronaczyń, wysoką aktywność mitotyczną a także obszary martwicy. Nowotwór ten tworzy się na skutek transformacji *de novo* (glejak wielopostaciowy pierwotny), bądź z nowotworów o niższym stopniu złośliwości (glejak wielopostaciowy wtórny) [Dropcho i Soong, 1996]. Nie stwierdzono wyraźnych różnic morfologicznych pomiędzy pierwotnymi a wtórnymi postaciami GBM. Na postać wtórną zapadają głównie osoby poniżej 45 roku życia, zaś na postać pierwotną częściej osoby starsze [Reifenberger i Collins, 2004].

Drugim przedstawicielem omawianej grupy jest różnicujący się w kierunku gleju astrocytarnego gwiaździatek anaplastyczny (*astrocytoma anaplasticum*, AA), o III stopniu złośliwości wg WHO [Kleihues i Cavenee, 2000]. Nowotwór ten w odróżnieniu od *glioblastoma multiforme* pozbawiony jest ognisk martwicy. Histologicznie gwiaździatek anaplastyczny wyróżnia duża liczba mitoz, atypia oraz duża gęstość komórkowa.

Glejaki o wysokim stopniu złośliwości charakteryzuje gwałtowna progresja oraz wyjątkowa oporność na leczenie. Pociąga to za sobą bardzo krótki okres przeżycia chorego, w przypadku GBM rzadko przekraczający 1 rok, nawet przy

skojarzonym leczeniu, obejmującym radioterapię, chemioterapię i resekcję chirurgiczną [Joy i wsp., 2003; Leśniak i Brem, 2004]. Taki stan rzeczy jest skutkiem obniżonej skłonności do apoptozy, wzrostu potencjału migracyjnego i inwazyjności zmienionych nowotworowo, wysoko anaplastycznych komórek astroglowych.

II. 3.2. Cechy glejaków na poziomie transdukcji sygnału wewnątrzkomórkowego

Dużo uwagi poświęcono zagadnieniu transdukcji sygnałów w glejakach i miejsca w tym procesie kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K) [Choe i wsp., 2003; Joy i wsp., 2003]. Kinaza ta fosforyluje 3,4-dwufosforan inozytolu (PIP₂) do 3,4,5-trójfosforanu inozytolu (PIP₃). PI3K pobudzana jest przez stanowiącą integralną część receptorów czynników wzrostowych kinazę tyrozynową oraz receptory sprzężone z białkami G [Vanhaesebroeck i Waterfied, 1999; Cantley, 2002]. PIP₃ pełni rolę wtórnego przekaźnika i jest wymagany do uaktywnienia kinazy Akt/PKB (kinaza białkowa B) przez zależną od fosfatydyloinozytolu kinazę PDK1 [Vogt, 2001]. Akt/PKB pełni kluczową rolę w regulacji metabolizmu komórkowego, procesów prożyciowych oraz pośrednio wpływa na cykl komórkowy, transkrypcję i translację. Skutkiem aktywacji szlaku PI3K/Akt jest fosforylacja i w konsekwencji zahamowanie aktywności białek proapoptotycznych, takich jak białko BAD [Yang i wsp., 1995]. Kinaza Akt fosforyluje i uniemożliwia migrację czynników transkrypcyjnych z rodziny Forkhead do jądra komórkowego, co z kolei ma związek ze wzrostem przeżywalności komórek [Aoki i wsp., 1998; Brunet i wsp., 1999]. Badania na hodowli pierwotnej neuronów korowych szczura wykazały, że aktywacja szlaku PI3K/Akt prowadzi do unieczynnienia kinazy syntazy glikogenu GSK 3β (ang. *glycogen synthase kinase 3β*), czego skutkiem jest zahamowanie procesu apoptozy [Hetman i wsp., 2000]. Innym następstwem aktywacji szlaku PI3K/Akt jest pobudzenie kinazy mTOR (ang. *mammalian Target of Rapamycin*), biorącej udział w modulacji translacji i pełniącej kluczowe miejsce we wzroście komórki, poprzez regulację kinazy p70S6K (ang. *40S ribosomal protein S6 kinase*) oraz białka 4EBP-1 (ang. *eukaryotic initiation factor 4E-binding protein*). Szlak ten w nowotworach wykazuje podwyższoną aktywność, a jego zahamowanie przez selektywny inhibitor kinazy mTOR – rapamycynę i jego analogi prowadzi do spowolnienia proliferacji komórek nowotworowych [Vogt, 2001; Sawyers, 2003].

W przypadku glejaków obserwuje się dodatkowe wzmocnienie szlaku sygnałowego inicjowanego przez PI3K, co promuje ekspansję i przyspiesza wzrost guza. Ma to miejsce wskutek unieczynnienia białka o aktywności fosfatazowej PTEN (ang. *phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*), które w niezmięnionej nowotworowo komórce ma własności antagonistyczne wobec PI3K: prowadzi do defosforylacji PIP₃ do PIP₂ [Maehama i Dixon, 1998; Maehama i Dixon, 1999; Cantley, 2002].

II. 3.3. Najistotniejsze zmiany na poziomie ekspresji genów

Gen supresorowy nowotworów kodujący PTEN zlokalizowany jest na chromosomie 10 w regionie q23, zaś delecje w tym obszarze są częstym zjawiskiem notowanym w wielu typach nowotworów [Li i wsp., 1997]. Cechą wspólną glejaków o najwyższym stopniu złośliwości są mutacje genu supresorowego, kodującego PTEN, których częstość określa się na około 30%. W przypadku linii wyprowadzonych z tych glejaków mutacje *PTEN* występują z częstością około 50 - 60% [Cantley i Neel, 1999]. Dodatkowa inaktywacja omawianego genu polega na metylacji sekwencji CpG (ang. *CpG islands*) w promotorze [Baeza i wsp., 2003]. Badania mutacji *PTEN* mają dużą wartość diagnostyczną, gdyż zmiany te korelują z obniżoną przeżywalnością chorych [Duerr i wsp., 1998; Sansal i Sellers, 2004].

Innym zaburzeniem genotypu powszechnie występującym w glejakach jest mutacja w genie *TP53*, występująca przede wszystkim w eksonach 5-8 [Watanabe i wsp., 1996]. Produktem *TP53* jest białko supresorowe nowotworów p53. Białko to indukuje ekspresję genów kodujących białka proapoptotyczne oraz pełni kluczową rolę w regulacji procesu apoptozy komórek po uszkodzeniu DNA [Owen-Schaub i wsp., 1995; Merzak i Pilkington 1997]. Brak ekspresji oraz mutacje tego genu silnie korelują z transformacją nowotworową komórek. Mutacje w *TP53* są typowe zarówno dla glejaków o najwyższym stopniu złośliwości, jak i glejaków o II stopniu złośliwości wg WHO [Smith i wsp., 2001]. Często spotykaną cechą glejaków jest utrata krótkiego ramienia chromosomu 17p (LOH - ang. *loss of heterozygosity*), gdzie zlokalizowany jest *TP53* [von Deimling i wsp., 1992].

Glejaki cechują różnorodne zmiany genetyczne protoonkogenów [Mariani i wsp., 2001]. Przykładem tego typu zaburzeń jest amplifikacja genu kodującego receptor czynnika wzrostu EGFR (ang. *epidermal growth factor receptor*)

sprzężonego z kinazą tyrozynową. Nadekspresja tego genu występuje w 40 - 62% omawianych guzów mózgu [Wong i wsp., 1987].

Glejaki złośliwe wykazują ponadto aberacje genetyczne genów kodujących białka regulujące cykl komórkowy i biorące udział w przejściu komórki z fazy G1 w fazę S. Przykładem tego typu zaburzeń jest amplifikacja i nadekspresja genów kodujących cykliny grupy D: D1, D2, D3, prowadząca do utraty kontroli cyklu komórkowego [Buschges i wsp., 1999]. Zestawienie najczęściej występujących zmian genetycznych onkogenów w glejakach przedstawia **Tabela II.3**.

Omawiane zmiany genetyczne, a w szczególności zaburzenia ekspresji genów: *PTEN*, *EGFR*, *TP53* wykorzystywane są na szeroką skalę w diagnostyce glejaków [Smith i wsp., 2001; Rasheed i wsp., 2002; Choe i wsp., 2003].

Tabela II.3. Protoonkogeny ulegające amplifikacji w glejakach

Protoonkogeny	Lokalizacja chromosomalna	Rola produktu genu
<i>EGFR</i>	7p11	receptor nabłonkowego czynnika wzrostu
<i>PDGFR</i>	4q12	receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu
<i>CDK4</i>	12q13	kinaza zależna od cyklin, promuje przejście komórki z fazy G ₁ do S cyklu komórkowego
<i>CDK6</i>	7q21–q22	kinaza zależna od cyklin, promuje przejście komórki z fazy G ₁ do S cyklu komórkowego
<i>CCND1</i>	11q13	cyklina D ₁ , promuje przejście komórki z fazy G ₁ do S cyklu komórkowego
<i>CCDN3</i>	6p21	cyklina D ₃ , promuje przejście komórki z fazy G ₁ do S cyklu komórkowego
<i>MDM 2</i>	12q15	inhibitor p53
<i>MDM 4</i>	1q32	inhibitor p53
<i>MYCC</i>	8q24	czynnik transkrypcyjny

wg Reifenger i Collins [2004], zmodyfikowane.

II. 3.4. Inwazyjność glejaków: rola układu glutamatergicznego i kanałów jonowych

Inwazyjność guzów OUN przebiega inaczej niż w nowotworach narządów obwodowych. Badania ostatnich lat wykazały istotną rolę ekscytotoksycznego działania kwasu glutaminowego w glejakach. Wynika ona z zaburzonego transportu tego aminokwasu, a skutkuje śmiercią otaczających guz neuronów i promuje ekspansję nowotworu. Zaburzenia transportu Glu wiążą się z zaburzeniem ekspresji i funkcjonowania białek pośredniczących w jego transporcie. Istnieją przesłanki wskazujące na szczególną rolę układu glutamatergicznego w procesie inwazyjności guzów OUN [Sontheimer, 2003].

W normalnych warunkach Glu po uwolnieniu z neuronów presynaptycznych jest następnie pobierany do astrocytów. Odbywa się to za pośrednictwem błonowych białek transporterowych, które zapobiegają ekscytotoksycznemu działaniu kwasu glutaminowego. Do najpowszechniej występujących białek transportujących Glu w mózgu zalicza się transportery układu X_{AG} : GLAST, inaczej określany jako EAAT-1 (ang. *excitatory amino acid transporter-1*) oraz GLT, inaczej określany jako EAAT-2 [Lehre i Danbolt, 1998]. Ye i Sontheimer [1999] wykazali, że linie wyprowadzone z glejaków (STTG-1, D-54MG, D-65MG, U-373MG, U-251MG, U-138MG, CH-235MG) cechuje upośledzony transport Glu w porównaniu z prawidłowymi astrocytami. Zjawisko to tłumaczy zaburzona ekspresja lub lokalizacja transporterów Glu. Badania immunohistochemiczne w glejakach *in situ* a także na modelu *in vitro* w liniach wywodzących się z guzów wykazały translokację z błon komórkowych do jądra transportera GLAST oraz znaczące obniżenie ekspresji transportera GLT [Ye i wsp., 1999]. Technika z wykorzystaniem mikromacierzy DNA (microarray) wykazała odwrotną korelację ekspresji tego wariantu ze stopniem złośliwości glejaków. Ekspresja transportera jest niska w glejakach złośliwych i wysoka w glejakach o niskim stopniu złośliwości. Badania de Groot i wsp. [2005] wykazały, że transfekcja linii glejaka (U251, U87, U373, SNB19) EAAT-2 skutkuje obniżeniem proliferacji komórkowej. W komórkach transfekowanych tym transporterem obserwuje się inicjację procesu apoptozy, objawiającą się aktywacją kaspazy -3 (ang. *caspases – cysteinyl-aspartic-acid-protease 3*), trawiącej białka komórkowe oraz rozpad białka PARP (ang. *poly ADP-ribose polymerase*), zaangażowanego w proces

naprawy DNA. Ponadto, badania *in vivo* wykazały, że komórki transfekowane EAAT-2 tracą fenotyp nowotworowy [de Groot i wsp., 2005].

Kolejnym mechanizmem przyczyniającym się do nagromadzenia Glu i jego ekscytotoksycznego działania jest zaburzona ekspresja antyportera cystyna (CySS) / glutaminian – transportera x_c^- [Chung i wsp., 2005]. Z badań na hodowli astrocytów wiadomo, że wewnątrzkomórkowe stężenie Glu wynosi około 1 mM natomiast jego stężenie zewnątrzkomórkowe przybiera wartości tysiąc razy niższe [Hertz i wsp., 1988]. Odwrotnie, stężenie zewnątrzkomórkowe CySS wielokrotnie przewyższa jej stężenie w astrocytach, w których ulega ona szybkiej redukcji do cysteiny (Cys) [Bannai i Kitamura, 1980]. Zgodnie z gradientami tych aminokwasów dominuje wpływ z komórki Glu jako wymiennika z CySS. W badanych liniach glejaków, w hodowli wyprowadzonej z glejaków oraz w glejakach *in situ* stwierdzono wysoką ekspresję wymiennika x_c^- , co skutkuje zwiększonym transportem Glu na zewnątrz komórki. Farmakologiczne hamowanie wymiennika x_c^- sulfazalanem blokuje syntezę DNA, osłabia żywotność komórek glejaka oraz indukuje zależną od kaspazy-3 apoptozę w badanych liniach glejakowych [Chung i wsp., 2005]. Cys, powstająca w komórce w wyniku redukcji CySS, jest kluczowym prekursorem w biosyntezie glutationu [Jefferies i wsp., 2003], czynnika odpowiedzialnego za oporność guzów na chemio- i radioterapię [Meister, 1991].

Wykazano, iż inwazyjność glejaków wiąże się z aktywnością receptorów jonotropowych (iGluR) (ang. *ionotropic glutamate receptors*) dla Glu: NMDA (receptory N-metylo-D-asparaginianowe) oraz AMPA (receptory α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowe). Ye i Sontheimer [1999] wykazali, że zastosowanie antagonisty receptora NMDA - MK801 (melainian dizocyłpiny) oraz niedobór Glu w medium hodowlanym zapobiega neurotoksycznemu działaniu kwasu glutaminowego. Hamownie receptora NMDA skutkuje obniżeniem proliferacji i wzrostu komórek linii glejaka. Taki sam efekt obserwuje się w warunkach hamowania receptora AMPA antagonistą - GYKI52466 (1-[4-aminofenylo]-4-metylo-7,8-metylenodioksy-5H-2,3-benzodiazepina) [Rzeski i wsp., 2000; Rzeski i wsp., 2002]. Takano i wsp. [2001] wykazali, że inhibitor receptorów NMDA - MK801 w znacznym stopniu obniża wzrost komórek glejaka C6 po implantacji do prądkowia szczura.

Układ glutamatergiczny w glejakach bierze udział w proliferacji i aktywacji zależnych od Ca^{2+} procesów antyapoptotycznych [Ishiuchi i wsp., 2002].

Przepuszczalne dla Ca^{2+} receptory AMPA powszechnie występują w komórkach gleju prawidłowego [Gallo i Ghiani, 2000]. Funkcjonalny receptor AMPA jest homomerycznym bądź heteromerycznym tetramerem złożonym z dwóch lub więcej podjednostek: GluR1, GluR2, GluR3, GluR4. Receptory AMPA, w skład których wchodzi podjednostka GluR2, wykazują znikomą przepuszczalność dla Ca^{2+} [Hollmann i Heinemann, 1994]. Badania immunocytochemiczne wykazały silną ekspresję podjednostki GluR1 i GluR4 oraz słabą GluR2 w materiale biopsyjnym pochodzącym z GBM. Transfekcja linii glejaka cDNA kodującym podjednostkę GluR2 obniżała przepuszczalność jonów Ca^{2+} z udziałem receptora AMPA. Konsekwencją zamiany receptora AMPA z przepuszczalnego na nieprzepuszczalny dla jonów Ca^{2+} była inicjacja procesu apoptozy a także zahamowanie proliferacji komórek linii glejaka. Istnieją przesłanki wskazujące, że transport Ca^{2+} z udziałem receptorów NMDA i AMPA skutkuje aktywacją kinazy Akt, zaangażowanej w procesy prożyciowe komórki [Ishiuchi i wsp., 2002] (porównaj podrozdział II. 3.2.).

Inną cechą odróżniającą glejaki od pozostałych nowotworów jest proces migracji. O ile inne nowotwory obwodowe ulegają pasywnej cyrkulacji w krwi bądź limfie, glejaki przystosowują się do pokonania wąskich przestrzeni w mózgu poprzez szybką regulację kształtu oraz objętości komórki [Merzak i Pilkington, 1997; Sontheimer, 2003]. Wykazano, że kurczenie się komórek glejaka związane jest z aktywacją kanałów Cl^- [Ransom i wsp., 2001]. Badania *in vitro* na liniach glejakowych wykazały, iż w wyniku działania swoistych inhibitorów kanałów Cl^- takich jak chlorotoksynina (Ctx), chlorek czteroetyloamonu (TEA) oraz tamoksyfen, zachodzi hamowanie migracji badanych ludzkich linii glejakowych w sposób zależny od podawanej dawki. Ponadto, badania z użyciem hodowli organotypowych wykazały obniżenie potencjału inwazyjności zarówno w przypadku linii glejaka, jak i komórek nowotworowych wywodzących się z materiału biopsyjnego w warunkach stosowania inhibitora kanałów Cl^- [Soroceanu i wsp., 1999; McFerrin i Sontheimer, 2006].

II. 3.5. Glejaki a regulacja pH

Inną cechą różniącą glejaki od gleju nietransformowanego jest gradient pomiędzy pH wewnątrzkomórkowym (pHi) a zewnątrzkomórkowym (pHe). W astrocytach pHe i pHi jest prawie identyczne i waha się w zakresie 7,0-7,5. W

glejakach pHe wynosi 6,5-6,9, pHi 7,12-7,24 mimo, iż zwiększona jest produkcja jonów H^+ [Hubesch i wsp., 1990; McLean i wsp., 2000]. Podobne zjawisko obserwowano w wielu typach komórek pochodzących z różnych nowotworów [Vaupel i wsp., 1989; Griffiths, 1991; Stubbs i wsp., 1995; Stubbs i wsp., 1999]. Utrzymywanie wysokiego pH wewnątrzkomórkowego jest istotne dla zachowania zwiększonej aktywności szeregu enzymów zaangażowanych w glikolizę, syntezę DNA, RNA oraz białek [Madshus, 1988; Miccoli i wsp., 1996]. Wysokie pHi koresponduje zatem ze zintensyfikowanym metabolizmem i proliferacją komórki, czyli z mechanizmami właściwymi procesowi nowotworzenia [Stubbs i wsp., 2000]. W przypadku glejaków utrzymanie wysokiego pHi i niskiego pHe wiąże się z aktywacją wymiennika Na^+/H^+ . Pojawiły się dane wskazujące na zwiększoną ekspresję tego antyportera w liniach glejaków ludzkich (U-118 i U-87) oraz glejaka szczurzego (C6) [McLean i wsp., 2000]. Z drugiej strony, nowsza praca pochodząca z tego samego laboratorium głosi, że inhibitor wymiennika Na^+/H^+ - amilorid, blokuje proliferację glejaka na zasadzie mechanizmu niezwiązanego z blokowaniem antyportera Na^+/H^+ , a raczej w związku z zahamowaniem wymiany Ca^{2+}/Na^+ [Hegde i wsp., 2004]. Regulacja pH w glejakach pozostaje zatem niejasna i wymaga dalszych badań. Problem ten wstępnie podjęto w niniejszej pracy.

II. 4. Rola Gln jako czynnika antyapoptotycznego

Istotną rolę w procesie apoptozy odgrywają kaspazy, trawiące białka komórkowe oraz endonukleazy fragmentujące DNA [Peitsch i wsp., 1994; Earnshaw i wsp., 1999]. Ostatnie doniesienia pośrednio wskazują na szczególne znaczenie glutaminy jako czynnika przeciwdziałającego aktywacji kaspaz. Badania na linii mysich komórek hybrydowych (Sp2/0-Ag14) wykazały, że niedobór Gln w medium hodowlanym skutkuje aktywacją kaspazy-9, kaspazy-3, powoduje fragmentację DNA oraz indukcję proteolitycznego rozpadu białka PARP. Zjawiskom tym towarzyszy uwalnianie mitochondrialnych markerów apoptozy: białka SMAC/DIABLO i cytochromu c do cytozolu, czy przemieszczenie proapoptotycznego białka Bax do mitochondriów [Paquette i wsp., 2005]. Inicjację procesu apoptozy z powodu niedoboru Gln w medium hodowlanym udokumentowano również na linii mysich komórek hybrydowych KB26.5 [Tinto i wsp., 2002].

Białka szoku cieplnego HSP, zwane również białkami opiekuńczymi, przeciwdziałają powstawaniu źle zwiniętych białek w warunkach stresu fizjologicznego komórki [Wischmeyer, 2002]. Chow i Zhang [1998] wykazali, że Gln chroni komórki nabłonkowe jelita szczura (IEC-6) w warunkach szoku cieplnego (43⁰C), a wzbogacenie medium hodowlanego w ten aminokwas znacząco poprawia przeżywalność tych komórek. Jednocześnie wykazano, że indukcja białka szoku cieplnego HSP70 była możliwa jedynie w obecności glutaminy. Podobne zjawisko zaobserwowano w komórkach nabłonkowych jelita szczura (IEC-18) [Wischmeyer i wsp., 1997]. Ci sami badacze wykazali, że glutamina indukuje białka HSP25 i HSP72, a także działa protekcyjnie w warunkach szoku endotoksynowego na modelu szczurzym *in vivo* [Wischmeyer i wsp., 2001].

II. 5. Miejsce Gln w procesach związanych z nowotworzeniem

II. 5.1. Metabolizm Gln

Eagle i wsp. [1956] w badaniach nad liniami komórkowymi, zaobserwowali wysokie zapotrzebowanie na glutaminę i jej niezastępowalność przez inne aminokwasy. Gln jest ważnym źródłem azotu do biosyntezy nukleotydów, białek, aminokwasów [Neu i wsp., 1996 Wasa i wsp., 1996 a; Fischer i wsp., 1998]. Jednocześnie jest ona jednym z głównych substratów energetycznych w komórkach szybko dzielących się, takich jak enterocyty [Klimberg i Souba, 1990], fibroblasty [Zetterberg i Engstrom, 1981], limfocyty [Ardawi i Newsholme, 1983; Curi i wsp., 1999], linii wyprowadzonej z raka szyjki macicy (HeLa) [Reitzer i wsp., 1979]. Glutamina jest determinantem wzrostu komórek nowotworowych, co zostało udokumentowane w liniach wyprowadzonych z nowotworu sutka, wątrobiaka ludzkiego (SK-Hep) oraz glejaka szczurzego (C6) [Collins i wsp., 1998; Pawlik i wsp., 2000; Dolińska i wsp., 2001]. W liniach komórkowych wyprowadzonych z nowotworów sutka, wątroby, okrężnicy, nerwiaka zarodkowego (SK-N-SH) wykazano zależność między szybkością syntezy DNA, białek, tempem wzrostu a stężeniem Gln [Wasa i wsp., 1996 b]. W przypadku linii SK-N-SH stwierdzono wpływ Gln na proliferację komórek poprzez regulację transportu innych aminokwasów [Soh i wsp., 2004]. Wykazano, że wzbogacenie medium hodowlanego w glutaminę w komórkach linii Caco-2 wyprowadzonej z ludzkiego gruczolaka

okreźnicy powoduje zwiększenie syntezy nukleotydów, a jednocześnie proliferacji tych komórek [Yamauchi i wsp., 2002].

Produkt hydrolizy Gln - kwas glutaminowy, jest prekursorem biosyntezy glutationu. GSH jest czynnikiem odpowiedzialnym za oporność guzów na chemio- i radioterapię [Meister, 1991; Miura i Sasaki, 1991; Nagane i wsp., 1995; Rouse i wsp., 1995]. Wykazano, że glutation bierze udział w regulacji wzrostu komórek nowotworowych, a także w formowaniu przerzutów komórek czerniaka złośliwego (B16) do wątroby [Carretero i wsp., 1999]. Istnieją doniesienia literaturowe sugerujące udział Gln w regulacji poziomu GSH. W linii SK-N-SH wykazano, że zmniejszenie zawartości glutaminy w medium hodowlanym przekłada się na spadek stężenia glutationu [Soh i wsp., 2004].

Szybko dzielące się komórki cechuje wysoka aktywność glutaminazy aktywowanej fosforanem. Zgodnie z tym aktywność PAG silnie koreluje z procesem nowotworzenia [Bode i Souba, 1994]. Lobo i wsp. [2000] wykazali, że wyciszenie genu kodującego PAG metodą antysensowego mRNA, z użyciem sekwencji skierowanej przeciwko konserwowanemu ewolucyjnie 3'-cDNA, osłabia wzrost i proliferację komórek guza wysiękowego Ehrlicha myszy *in vitro*. Ponadto badania *in vivo* na myszach wykazały, że komórki transfekowane sekwencją antysensowego PAG tracą zdolność transformacji w kierunku nowotworu.

II. 5.2. Transport Gln w nowotworach

Wzmocnionemu metabolizmowi glutaminy sprzyja jej bardziej intensywny transport przez błony komórek nowotworowych [Souba, 1993; Wasa i wsp., 1996 b; Witte i wsp., 2002]. Podwyższoną aktywność transportu Gln notowano w homogenatach nowotworów oraz w liniach nowotworowych [Medina i wsp., 1992]. W przypadku komórek wątrobiaka obserwuje się 10 – 20- krotnie szybszy transport w porównaniu z prawidłowymi hepatocytami człowieka [Bode i wsp., 1995; Bode i Souba, 1994]. Zmienione nowotworowo fibroblasty wykazują 6-krotnie zwiększony transport Gln oraz 3-krotnie zwiększoną syntezę białek w porównaniu do prawidłowych fibroblastów [Fischer i wsp., 1998]. Udowodniono również, iż chemioterapeutyczne zahamowanie proliferacji nowobiocyną lub maślanem sodu w badanych liniach wątrobiaka skutkuje upośledzeniem transportu Gln [Bode i Souba, 1994].

II. 6. ASCT2 i LAT1 a nowotworzenie: integracja funkcji

Cechą wspólną nowotworów obwodowych i występujących w OUN jest wzrost ekspresji transportera ASCT2. Ekspresję ASCT2 notuje się w hepatocytach zmienionych nowotworowo, ale nie stwierdza się jej w prawidłowych komórkach [Bode i wsp., 1995]. Nadekspresja ASCT2, jest wspólną cechą linii wyprowadzonych z raka wątroby (HCC; SK-Hep; Focus; HepG2; Hep3B; Huh-7) [Bode i wsp., 1995; Bode i wsp., 2002]. Fischer i wsp. [1998] wykazali, że o ile w zdrowych fibroblastach transport Gln odbywa się w równym stopniu z udziałem układu A i ASC, w przypadku fibroblastów zmienionych nowotworowo funkcję transportu tego aminokwasu całkowicie przejmuje układ ASC. Istnieje kilka doniesień w literaturze dokumentujących dominujący udział układu ASC w transporcie Gln w liniach wyprowadzonych z nowotworów OUN. Wykazano, że ASCT2 odpowiada za transport glutaminy w linii glejaka szczurzego (C6) [Dolińska i wsp., 2003], ludzkiego (T98G) [Sidoryk i wsp., 2006] oraz ludzkiego nerwiaka zarodkowego (SK-N-SH) [Wasa i wsp., 2002]. Ekspresja tego transportera i jego aktywność w ludzkim i szczurzym gleju transformowanym zostanie szczegółowo omówiona w dalszych częściach niniejszej rozprawy.

Istnieją doniesienia dokumentujące powiązanie ekspresji ASCT2 z uzyskaniem przez komórki nowotworowe zdolności do ekspansji i szybszego wzrostu *in vivo*. Stwierdzono, że nadekspresja transportera ma związek z inwazyjnością nowotworów, a także koreluje z obniżoną przeżywalnością chorych na raka okrężnicy i progresją raka gruczołu krokowego [Witte i wsp., 2002; Li i wsp., 2003]. Fuchs i wsp. [2004] wykazali, że wyciszenie genu kodującego ASCT2 metodą antysensowego mRNA w linii wątrobiaka ludzkiego (SK-Hep) hamuje transport glutaminy, wywołuje obniżenie poziomu mRNA kodującego ASCT2 oraz w znacznym stopniu zmniejsza liczbę komórek w hodowli. Jakkolwiek w tych warunkach doświadczalnych ma miejsce uruchamianie mechanizmu kompensacyjnego w postaci wzrostu ekspresji mRNA dla innego przedstawiciela układu ASC - ASCT1, ale mechanizm ten jest zupełnie nieskuteczny. Unieczynienie ASCT2 prowadziło do aktywacji kaspazy-3, kaspazy-2, kaspazy-9 i w mniejszym stopniu kaspazy-8, indukcji proteolitycznego rozpadu białka PARP a w efekcie do apoptozy komórek. Dane te przemawiają za istotną rolą ASCT2 we wzroście i

żywołności komórek SK-Hep i tym samym sugerują istotną rolę tego białka w procesie nowotworzenia.

Kolejnym dobrze opisanym w literaturze transporterem, którego ekspresja koreluje z nowotworzeniem jest transporter LAT1. Ekspresję tego transportera notuje się w liniach wątrobiaka (dRLh-84) i raka wątroby (FAA-HTC1) szczura, ale nie stwierdza się jego obecności w zdrowych komórkach wątroby szczura [Kanai i wsp., 1998]. LAT1 wykazuje nadekspresję i pobudza transport Leu w wielu liniach nowotworowych, w tym czerniaka złośliwego (G-361), raka szyjki macicy (HeLa), raka płuc (RERF-LC-MA), raka pęcherza moczowego (T24) [Kanai i wsp., 1998; Yanagida i wsp., 2001; Kim i wsp., 2002]. Proporcjonalną zależność pomiędzy wzrostem ekspresji tego transportera a stadium nowotworu obserwowano w przypadku raka przelyku [Kobayashi i wsp., 2005]. W pierwotnej hodowli astrocytów transport Leu zachodzi z udziałem transportera LAT2, podczas gdy w linii glejaka C6 funkcję tę przejmuje wariant LAT1 [Kim i wsp., 2004]. W linii wyprowadzonej z raka sutka człowieka (MCF-7) wykazano ponad 200-krotnie wyższą ekspresję mRNA kodującego LAT1 w porównaniu z LAT2 [Shennan i wsp., 2004]. Iniekcja do śledziony szczura komórek raka okrężnicy (RCN-9) wzmacnia i indukuje przerzuty do innych narządów, a proces ten wykazuje silną korelację z ekspresją LAT1 [Ohkame i wsp., 2001; Tamai i wsp., 2001].

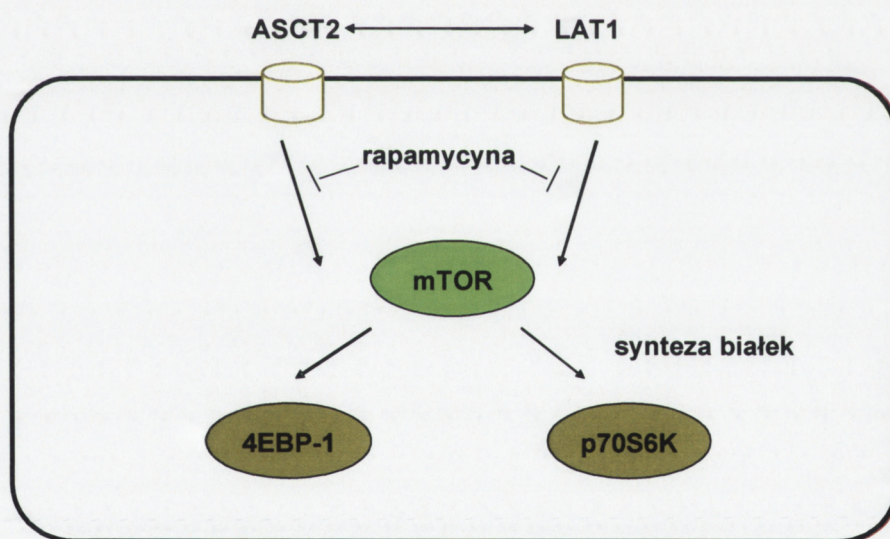
Istnieje kilka doniesień w literaturze dotyczących ekspresji i funkcji transportera LAT1 w nowotworach pochodzenia glejowego. Nawashiro i wsp. [2006] wykazali, że wysoka ekspresja omawianego transportera koreluje z niską przeżywalnością chorych na GBM. Ta sama grupa badaczy dowiodła, iż specyficzny inhibitor LAT1 - BCH hamuje, w sposób zależny od dawki, wzrost linii glejaka C6.

Potencjalnie korzystną dla terapii przeciwnowotworowej cechą transportera LAT1, jest transport przez błony komórkowe melfalanu. Transport tego leku za pośrednictwem transportera udokumentowano w transfekowanych transporterem oocytach [Yanagida i wsp., 2001; Uchino i wsp., 2002], linii wyprowadzonej z raka sutka (MDA-MB-231) [Shennan i wsp., 2004] oraz raka pęcherza moczowego (T24) [Kim i wsp., 2002].

Jedna z wcześniejszych prac sugerowała istnienie czynnościowych powiązań pomiędzy LAT1 i ASCT2. Wasa i wsp. [1996 b] wykazali, że niedobór substratu dla układu L - leucyny w hodowli komórek wątrobiaka wzmacnia aktywność układu ASC, zaś niedobór glutaminy indukuje wychwyt Leu przez układ L.

Ostatnie doniesienia sugerują, że mechanizm działania obu transporterów może opierać się na aktywacji kinazy serynowo-treoninowej mTOR. Kinaza ta zaangażowana jest w szlak sygnałowy PI3K/Akt, pełni rolę sensora aminokwasów i czynników wzrostu w cyklu komórkowym [Fingar i Blenis, 2004] oraz odgrywa istotną rolę w procesie nowotworzenia [Vogt, 2001] (porównaj podrozdział II.3.3) (**Ryc. II.2**). Analiza ekspresji genów za pomocą mikromacierzy DNA wykazała wspólny efekt niedoboru glutaminy i hamowania kinazy mTOR na profil ekspresji genów. W tych warunkach obserwuje się hamowanie ekspresji genów kodujących ASCT2 i LAT1 w komórkach chłoniaka człowieka [Peng i wsp., 2002]. Z drugiej strony zaburzenie funkcji ASCT2 i LAT1 hamuje szlak sygnałowy, w którym uczestniczy mTOR [Fuchs i Bode, 2005].

Ryc. II.2. Zintegrowany szlak działania ASCT2 i LAT1 w komórce nowotworowej: hipoteza



Aminokwasy transportowane przez transportery ASCT2 i LAT1 (głównie leucyna) aktywują kinazę mTOR (ang. mammalian Target of Rapamycin), która moduluje proces translacji poprzez regulację kinazy p70S6K (ang. 40S ribosomal protein S6 kinase) oraz białka 4EBP-1 (ang. eukaryotic initiation factor 4E-binding protein); \longrightarrow aktywacja, \dashv hamowanie. Częściowo opracowane na podstawie Fuchs i Bode [2005].

III. CEL PRACY

W tkankach zmienionych nowotworowo, zwiększone zapotrzebowanie na glutaminę wiąże się ze wzmożonym transportem tego aminokwasu przez błony komórkowe. Rolę transportu glutaminy w nowotworach narządów obwodowych opisano stosunkowo dobrze, brak jednak było takich opisów w odniesieniu do nowotworów ośrodkowego układu nerwowego. Zagadnienie to stało się jeszcze bardziej aktualne w świetle pojawienia się opisów różnych nowych białek transportujących glutaminę w OUN.

Celem niniejszej pracy było porównanie ekspresji i ewentualnie funkcji głównych transporterów glutaminy należących do układów A, N oraz ASC w prawidłowych i zmienionych nowotworowo tkankach ośrodkowego układu nerwowego. Badania rozpoczęto od analizy materiału biopsyjnego pochodzącego z operacji neurochirurgicznych złośliwych glejaków ludzkich (*glioblastoma multiforme*, *astrocytoma anaplasticum*) oraz przerzutów do układu nerwowego nowotworów innych narządów. Aby ocenić zmienność ekspresji transporterów w komórkach nowotworowych podczas ich przebywania poza naturalnym środowiskiem, przeprowadzono badania na hodowlach pierwotnych wyprowadzonych z glejaków oraz na liniach wyprowadzonych z glejaków: szczurzej (C6) oraz ludzkiej (T98G).

W centrum uwagi w niniejszej pracy znalazł się transporter SNAT3. Konstruując pytania szczegółowe wzięto pod uwagę doniesienia wskazujące na sugerowaną rolę SNAT3 w regulacji pH w nerce i obecność w obrębie mRNA kodującego SNAT3 sekwencji wrażliwej na zmiany pH [Karinch i wsp., 2002; Solbu i wsp., 2005]. Postawiono następujące pytania:

- Czy hodowanie komórek glejaka w warunkach długotrwałej zmiany pH w medium powoduje zmiany ekspresji i stabilności mRNA kodującego SNAT3 i/lub jego udziału w transporcie Gln?
- Jaka jest względna rola SNAT3 i wymiennika Na^+/H^+ - podstawowego „narzędzia” regulacji pH w komórce, w przystosowaniu komórek do długotrwałych zmian pH środowiska inkubacyjnego?

Aby odpowiedzieć na to pytanie, badano skutki farmakologicznego zahamowania aktywności wymiennika na ekspresję mRNA kodującego transporter SNAT3 oraz na żywotność i pH wewnątrzkomórkowe komórek.

Postanowiono także odpowiedzieć na pytanie czy wyciszenie genu kodującego SNAT3 wpłynie na proces namnażania komórek i proliferację gleju transformowanego nowotworowo.

Ponadto oceniono ekspresję mRNA kodującego SNAT3 w następujących warunkach:

- W obecności inhibitora PI3K, celem zbadania wpływu szlaku sygnałowego inicjowanego przez tę kinazę w linii glejaka T98G,
- W prawidłowych astrocytach poddanych działaniu czynnika karcynogennego (akrylamid).

IV. MATERIAŁY I METODY

IV. 1. Materiał biopsyjny nowotworów mózgu

Do badań wykorzystano drobne fragmenty materiału biopsyjnego guzów pochodzenia glejowego: glejaka wielopostaciowego - *glioblastoma multiforme* (GBM) o IV stopniu złośliwości wg WHO, gwiazdziaka anaplastycznego - *astrocytoma anaplasticum* (AA) o III stopniu złośliwości wg WHO oraz przerzutów do OUN z nowotworów obwodowych. Analizowano również pojedynczy przypadek skąpodrzewiaka – *oligodendroglioma* o II stopniu złośliwości wg WHO [Kleihues i Cavenee, 2000]. Jako kontroli używano fragmentów mózgu z obrzeża guza bez wyraźnego nacieku nowotworowego. Materiał biopsyjny pochodził z kilku klinik neurochirurgicznych: Szpitala Akademii Medycznej, Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej, Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. N. Barlickiego w Łodzi.

Materiał po operacji przechowywano w buforze RNA later (Sigma), a następnie mrożono w -70°C . Część materiału używanego do badań utrwalano w 10% formaldehydzie w celu późniejszej rutynowej diagnozy i badań immunohistochemicznych.

Materiał diagnozowano w Klinice Neurochirurgii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. N. Barlickiego w Łodzi, bądź w Zakładzie Neuropatologii Doświadczalnej i Klinicznej IMDiK, PAN w Warszawie.

IV. 2. Hodowle komórkowe

IV. 2.1. Hodowle pierwotne astrocytów

Fragmenty kory nowonarodzonych szczurów rasy Wistar [Hertz i wsp., 1989] przenoszono na sterylną siatkę nylonową (80 μm), umiejscowioną w szalce Petriego zawierającej 10 ml pożywki DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (GIBCO/BRL), wzbogaconej 20% płodową surowicą bydlęcą FBS (ang.

fetal bovine serum) (GIBCO/BRL) oraz antybiotykami: penicyliną (50 U/ml) i streptomycyną (50 mg/ml) (GIBCO/BRL). Używając szklanej szpatułki, tkanę przecierano do w/w medium hodowlanego. Po tygodniu zmieniano zawartość surowicy na 15%, a po kolejnym tygodniu na 10%. Gęstość komórek używanych do doświadczeń wynosiła $2-3 \times 10^6/\text{cm}^2$, co przypadało na trzeci tydzień od momentu założenia hodowli.

IV. 2.2. Hodowle pierwotne wyprowadzone z glioblastoma multiforme i astrocytoma anaplasticum

Fragment materiału biopsyjnego cięto na skrawki o średnicy 2-3 mm, a następnie poddawano trawieniu poprzez inkubację z kolagenazą (200 U/ml) (GIBCO/BRL) i 20% surowicą bydlęcą (FBS) przez 18 - 24h w 37°C. Komórki następnie wirowano i hodowano na 60 mm plastikowych szalkach. Medium hodowlane stanowiło DMEM (GIBCO/BRL) wzbogacone 10% FBS, 2 mM glutaminą oraz antybiotykami: penicyliną (50 U/ml) i streptomycyną (50 mg/ml) (GIBCO/BRL). Hodowle prowadzono w inkubatorze ze stałym przepływem CO₂ (5%) w temperaturze 37°C, w atmosferze o stałej wilgotności, zmieniając medium co 2-3 dni do momentu uzyskania hodowli konfluentnej. Czas namnażania wynosił 3-4 tygodnie.

IV. 2.3. Hodowle linii glejaków C6 i T98G

Linie glejaka szczurzego C6 i ludzkiego T98G pochodziły z American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD. Komórki linii glejaka C6 hodowano w pożywce DMEM (GIBCO/BRL). Komórki linii glejaka T98G hodowano w pożywce MEM (*Minimum Essential Medium Eagle*) (Sigma) wzbogaconej aminokwasami (Sigma). W hodowlach obu linii w skład pożywki wchodziły ponadto: 10% FBS (Sigma), antybiotyki: penicylina (50 U/ml) i streptomycyna (50 mg/ml) (GIBCO/BRL) oraz w linii C6 - Gln (2 mM). Do doświadczeń używano pasaży od 65 do 80 w przypadku linii C6 i od 8 do 20 w przypadku linii T98G. Komórki namnażano w temperaturze 37°C w mieszaninie 90% powietrza i 10% CO₂. Czas namnażania wynosił 72h. Gęstość komórek używanych do doświadczeń wynosiła około $4,25 \times 10^4 /\text{cm}^2$. Hodowle, zależnie od przeznaczenia, prowadzone

były na: szalkach o średnicy 3 cm (izolacja RNA, pomiar wewnątrzkomórkowego pH); płytkach 6-studzienkowych (izolacja RNA, pomiar wewnątrzkomórkowego pH, wyciszanie genu transportera SNAT3) lub płytkach 24-studzienkowych (wychwyty glutaminy, test MTT, wyciszanie genu transportera SNAT3).

IV. 3. Badania histopatologiczne i immunohistochemiczne

Badania immunohistochemiczne wykonano na skrawkach parafinowych o grubości około 5-6 μm , uzyskanych po krojeniu kostek parafinowych z zatopionym materiałem pooperacyjnym guzów pochodzenia glejowego przy pomocy mikrotomu (Leica). Następnie skrawki te przenoszono do łaźni wodnej o temperaturze wody ok. 50°C, po czym umieszczano je na szkiełkach podstawowych pokrytych aminosilanem (Sigma). Tak przygotowane preparaty odparafinowano zanurzając kolejno w ksylenie, alkoholu 99%, 96%, 70% i wodzie destylowanej.

Hodowle linii komórkowej T98G do badań immunocytochemicznych prowadzono na szkiełkach w szalkach o średnicy 3 cm.

Przed barwieniem komórki utrwalano w 4% roztworze paraformaldehydu. W celu odzyskania właściwości antygenowych wszystkie preparaty (z wyjątkiem przeznaczonych do znakowania białka GFAP) inkubowano w temperaturze 100°C w 10 mM buforze cytrynianowym o pH 6,0 i płukano kolejno w: buforze PBS (pH 7,4); 3% H_2O_2 (blokowanie endogennej peroksydazy); buforze PBS (pH 7,4). Kolejnym etapem była inkubacja w 10% roztworze albuminy przez 15 min. Następnie używano poniższych przeciwciał I-rzędowych zawieszonych w 1% albuminie:

- 1) poliklonalne przeciwciało anti-GFAP (DAKO), w rozcieńczeniu 1:4000;
- 2) monoklonalne przeciwciało anti-wimentyna (DAKO), w rozcieńczeniu 1:100;
- 3) monoklonalne przeciwciało anti-Ki-67 - klon MIB-1 (DAKO), w rozcieńczeniu 1:100;
- 4) poliklonalne przeciwciało anti-SNAT3, 3 $\mu\text{g/ml}$ (uzyskane dzięki uprzejmości dr Farrukha Chaudhry z Uniwersytetu w Oslo)

i inkubowano z nimi utrwalone komórki w temperaturze pokojowej przez 40 minut (przeciwciało anti-wimentyna, MIB-1), 15 minut (przeciwciało anti-GFAP) albo przez całą noc (w przypadku przeciwciała anti-SNAT3). Po zakończonej inkubacji dodawano biotynylowane przeciwciało II rzędowe: anti-królicze IgG w

rozcieńczeniu 1:1500 (w 1% albuminie) lub anty-mysie IgG (Beckman Coulter) w rozcieńczeniu 1:1500 (w 1% albuminie). Po przepłukaniu buforem PBS, materiał inkubowano z kompleksem znacznikowym streptawidyna - peroksydaza (Beckman Coulter) w rozcieńczeniu 1:500 przez 45 min. Preparaty ponownie przepłukiwano w buforze PBS i wywoływano reakcję barwną stosując chromogen (substrat dla peroksydazy): tetrachlorowodorek 3,3'-diaminobenzzydiny DAB (DAKO) przez 1 min. Produktem w miejscu reakcji był brunatny precypitat.

W celu uwidocznienia jąder komórkowych zastosowano barwienie hematoksyliną Meyera. Materiał poddawano działaniu wzrastających stężeń etanolu (70%, 96%, 99%) oraz ksylenem, po czym zatapiano w balsamie kanadyjskim i zamykano szkiełkami nakrywkowymi.

Preparaty analizowano w mikroskopie świetlnym (NIKON Eclipse E800). Dokumentację fotograficzną sporządzono w programie komputerowym (NIS-Elements BR NIKON).

IV. 4. Warunki hodowania komórek w medium o zmienionym pH

Obniżenie pH pożywki z 7,4 do 6,3 (niższego od stosowanego w doświadczeniu) powodowano poprzez podanie 1 mM HCl. Tak przygotowane medium stabilizowano w inkubatorze w 37⁰C, gdzie po 30 minutach jego pH rosło do żądanego 6,5. Komórki przepłukiwano buforem PBS i dodawano pożywkę o obniżonym pH. Podczas 4h inkubacji kontrolowano pH medium hodowlanego i w przypadku jego zmiany wymieniano pożywkę na medium o pH 6,5.

IV. 5. Badanie żywotności komórek - test MTT

Pomiar soli tetrazolowej MTT wykonywano na płytkach 96-dołkowych. Przeżywalność komórek oceniano poprzez pomiar konwersji żółtego, rozpuszczalnego w wodzie bromku 3-(4,5-dimetylo 2-tiazolylo)-2,5-difenylo-tetrazolowego (MTT) na nierozpuszczalny w wodzie niebieski formazan [Mosmann, 1983]. Reakcja ta katalizowana jest przez enzym mitochondrialny - dehydrogenazę bursztynianową. Gęstość optyczną, proporcjonalną do liczby żywych komórek oceniano przy użyciu spektrofotometru (BioRad) przy długości fali 595 nm.

IV. 6. Analiza namnażania komórek

Komórki przemywano buforem PBS, a następnie dodawano 1 ml trypsyny (GIBCO/BRL) i inkubowano 5 minut w 37⁰C. Następnie dodawano 1 ml pożywki i wirowano w 1000 x g przez 5 minut. Do zawiesiny komórek (8 μ l) dodawano równą objętość błękitu trypanu (0,4%) (Sigma). Liczbę żywych komórek niezabarwionych tym odczynnikiem szacowano przy użyciu komory do liczenia (Sigma) w mikroskopie świetlnym (NIKON Eclipse E800) wg wzoru: liczba komórek x 2 x 10⁴/ml.

IV. 7. Badanie proliferacji komórek

Do badania indeksu proliferacji używano monoklonalnego przeciwciała anty-Ki-67 (DAKO), w rozcieńczeniu 1:100. Komórki linii glejaka T98G poddawano barwieniu immunocytochemicznemu, jak opisano w podrozdziale IV.3.

Indeks proliferacji stanowił procent komórek wykazujących ekspresję jądrowego białka Ki-76 w przeliczeniu na 1000 komórek analizowanych w mikroskopie świetlnym (NIKON Eclipse E800).

IV. 8. Detekcja apoptozy

Komórki barwiono odczynnikami Hoechst 33258 (Sigma) (2,5 μ g/ml). Hoescht 33258 jest barwnikiem fluorescencyjnym, o zdolności penetracji do komórek i DNA, co prowadzi do wybarwienia chromatyny jądrowej. Umożliwia to obserwację kondensacji chromatyny podczas apoptozy. Wybarwione Hoechst 33258 komórki poddawano ocenie morfologicznej w mikroskopie fluorescencyjnym o odwróconej optyce (Zeiss Axiovert 25) przy zastosowaniu filtrów do lampy UV.

IV. 9. Pomiar wewnątrzkomórkowego pH

Wewnątrzkomórkowe pH w liniach C6, T98G oraz w hodowli pierwotnej astrocytów mierzono metodą fluorescencyjną z użyciem sondy BCECF AM 2',7'-estru acetometylu 2',7'-di-(2-karboksyetylo)-5-6-karboksyfluoresceiny (Molecular Probes). Komórki poddawano działaniu BCECF-AM przez 15 minut w 37⁰C, a

następnie przemywano buforem zawierającym 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0,5 mM Na₃PO₄, 20 mM HEPES, 1 mM CaCl₂, 135 mM NaCl, (295 mOsm, pH 7,4) i inkubowano w tym buforze podczas doświadczenia. Pomiar wewnątrzkomórkowego pH prowadzono w 37⁰C z użyciem fluorymetru Fluoroscans Ascent FL (emisja przy $\lambda = 538$ nm, ekscytacja przy $\lambda = 440$ i 490 nm). Kalibracja BCECF-AM opierała się na miareczkowaniu przy pomocy NaOH i HCl w obecności 0,003% digitoniny (Sigma).

IV. 10. Analiza RT-PCR

Ekspresję genów kodujących białka transportujące glutaminę oceniano poprzez analizę ilości mRNA dla danego transportera metodą reakcji odwrotnej transkrypcji (RT-PCR) z zastosowaniem specyficznych starterów.

IV. 10.1. Izolacja RNA

Całkowity RNA izolowano z komórek lub materiału pooperacyjnego zmodyfikowaną metodą Chomczyńskiego i Sacchi [1987], używając odczynnika TRIzol Reagent (Sigma). Komórki rosnące na 3 cm szalkach, po odpłukaniu medium hodowlanego buforem PBS, zawieszano w 1 ml TRIzol-u a następnie inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. W przypadku materiału pooperacyjnego, jego fragmenty (od 30 - 100 mg) zawieszano w 1 ml TRIzol-u, homogenizowano w homogenizatorze teflon-szkło (Whatman, Biometra) i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Do zawiesiny dodawano 0,2 ml chloroformu, po czym całość wytrząsano przez 15 sekund, a następnie inkubowano przez 3 minuty w temperaturze pokojowej. Próbkę wirowano przy 12 000 x g przez 15 minut w 4⁰C. Do fazy wodnej, zawierającej RNA, dodawano 0,5 ml izopropanolu, inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut, po czym wirowano przy 12000 x g przez 10 minut w 4⁰C. Osad przemywano 1 ml 75% etanolu i zawieszano w wodzie zawierającej 0,1 % inhibitor RNAz – dietylopirowęglan - DEPC (Sigma). Czystość oraz stężenie RNA mierzono na spektrofotometrze Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech) i oznaczano zgodnie z zasadą, że OD 1 oznacza w przybliżeniu stężenie 40 μ g/ml RNA. Czystość RNA

szacowano na podstawie stosunku wartości odczytów gęstości optycznej przy 260 nm i 280 nm. Do badań wykorzystywano RNA o stosunku wyższym od 1,6.

IV. 10.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Całkowity wyizolowany RNA (2-5 µg) stanowił matrycę dla odwrotnej transkryptazy, przepisującej RNA na cDNA (DNA komplementarne do mRNA), przy użyciu zestawu Superscript II (Invitrogen). Wymogiem działania odwrotnej transkryptazy RT (ang. *reverse transcriptase*, EC 2.7.7.49) jest obecność w mieszaninie reakcyjnej sparowanego z RNA startera z wolną grupą 3'-hydroksylową. W doświadczeniach używano startera oligo(dT₁₂₋₁₈), komplementarnego do sekwencji poli(A) znajdującej się na końcu 3' większości eukariotycznych mRNA. W obecności mieszaniny 4 trifosforanów deoksyrybonucleozydów (dNTP mix, Sigma) odwrotna transkryptaza syntetyzuje pozostałą komplementarną do mRNA część cDNA. Reakcja katalizowana przez ten enzym obejmuje następujące reakcje: syntezę DNA na matrycy RNA, syntezę DNA na matrycy DNA oraz hydrolizę RNA.

Mieszaninę zawierającą: RNA w objętości zależnej od jego wyjściowego stężenia; 1 µl oligo(dT₁₂₋₁₈) oraz 1 µl 10 mM dNTP mix, uzupełniano wodą zawierającą DEPC do końcowej objętości 12 µl inkubowano przez 5 minut w 65°C, a następnie przynajmniej 1 minutę w lodzie. W następnej kolejności dodawano 4 µl 5 x stężonego buforu zawierającego 250 mM Tris-HCl (pH 8,3); 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 2 µl 0,1 M DTT oraz 1 µl wody i inkubowano 2 minuty w 37°C. Następnie do mieszaniny dodawano 1 µl odwrotnej transkryptazy Superscript II i inkubowano 50 minut w 37°C a następnie 15 minut w 70°C.

IV. 10.3. Reakcja PCR

Uzyskane cDNA (2 µl) amplifikowano metodą PCR (ang. *polymerase chain reaction*) przy użyciu starterów syntetyzowanych w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Nukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN komplementarnych do sekwencji z banku genów (GenBank w serwerze NCBI). Poziom ekspresji analizowanych genów odnoszono do poziomu ekspresji genu kodującego białko konstytutywne - dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego

- GAPDH (EC 1.2.1.12), niezmiennego w warunkach doświadczalnych i stanowiącego odniesienie do standaryzacji metody. Sekwencje starterów wykorzystanych w analizie RT-PCR, wielkość uzyskanych produktów i numer z banku genów przedstawia **Tabela IV.1**. W pracy wykorzystano nomenklaturę wprowadzoną przez Mackenzie i Erickson [2004] dla białek transportujących Gln.

Reakcja PCR składa się z następujących etapów, które powtarzają się cyklicznie: (i) denaturacja DNA w temperaturze 94⁰C; (ii) hybrydyzacja starterów oligonukleotydowych z niemi DNA, w temperaturze zależnej od temperatury topnienia starterów (temperatura niższa o kilka stopni od temperatury topnienia starterów); (iii) synteza nowej nici DNA w 72⁰C.

Mieszanina inkubacyjna używana do przeprowadzania reakcji PCR zawierała następujące składniki:

• 10 x PCR Bufor [750 mM Tris-HCl (pH 8,8); 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,1% Tween 20]	2,5 µl
• MgCl ₂ (25 mM)	2,0 µl
• dNTP (10 mM)	1,0 µl
• cDNA	2,0 µl
• starter F (10 µM)	1,0 µl
• starter R (10 µM)	1,0 µl
• polimeraza Taq (0,5 jednostek/µl) - 0,5 jednostek/reakcję	1,0 µl

Próbki uzupełniano wodą do końcowej objętości 25 µl. Reakcję PCR wykonywano w termocyklerze (Biometra) w następujących warunkach:

• Denaturacja wstępna	94 ⁰ C - 2 min	
• Denaturacja	94 ⁰ C - 1 min	
• Przyłączanie starterów		} 30 cykli
• GAPDH człowiek/szczur	59 ⁰ C - 1 min	
• SNAT3 człowiek/szczur	59 ⁰ C - 1 min	
• ASCT2 człowiek	59 ⁰ C - 1 min	
• ASCT2 szczur	55 ⁰ C - 1 min	
• SNAT5 człowiek	59 ⁰ C - 1 min	
• SNAT1 człowiek	54 ⁰ C - 1 min	
• SNAT1 szczur	55 ⁰ C - 1 min	
• Wydłużanie łańcucha	72 ⁰ C - 2 min	
• Faza ostatecznego wydłużania	72 ⁰ C - 7 min	

Tabela IV. 1. Sekwencje i pozycja starterów wykorzystanych w analizie RT-PCR, wielkość produktu oraz numer w banku danych

Nazwa genu	Sekwencja (5'- 3')	Pozycja	Wielkość produktu (pz)	Numer w banku danych
Człowiek / Szczur				
<i>GAPDH</i>	F tgaaggtcggagtcaacggattgg	80-104	998	18202056
	R catgtaggccatgaggtccaccac	1062-1038		
<i>SNAT3</i>	F aacatcggagccatgtccag	585-557	578	40795668
	R aaggtgaggtagccgaagag	1159-1140		
Człowiek				
<i>SNAT5</i>	F ggaactgcaggatccaaaga	846-865	303	15723369
	R aggtcagcaggaggtggatg	425-407		
<i>ASCT2</i>	F ccgctgatgatgaagtgc	1662-1679	507	5032092
	R ccccgatagtgtttgag	2168-2151		
<i>SNAT1</i>	F cccgaggatgataacattag	509-528	479	21361928
	R ttatggcagagggtagttc	986-968		
Szczur				
<i>ASCT2</i>	F gccagtccacggccaagatc	1769-1750	687	4454308
	R gcctggctgtgttcgtata	1086-1102		
<i>SNAT1</i>	F cccattgtcactgctgagaa	1015-1034	497	31343536
	R tcctgatagtgggacaaa	1695-1676		

IV. 10.4. Elektroforeza

Produkt PCR (5 µl) poddawano rozdzielni elektroforetycznemu w 1,5 % żelu agarozowym w buforze 0,5 x TBE (0,045 M TRIS-boran; 0,0001 M EDTA) przy natężeniu 50-80 V przez 2 - 4h. Żel agarozowy zawierał bromek etydyny (50 µg/ml), który po związaniu z DNA i wzbudzeniu światłem nadfioletowym intensywnie fluoryzuje, emitując światło o pomarańczowym zabarwieniu. Produkty PCR oglądano w ultrafiolecie, a następnie poddawano ilościowej analizie

densytometrycznej i dokumentowano fotograficznie w celu ilościowej oceny ekspresji mRNA genów. Poziom ekspresji białek transportujących Gln badano w odniesieniu do ekspresji genu kodującego białka konstytutywnego – GAPDH. Komputerowa analiza obrazu żelu w świetle UV została wykonana w aparacie Nucleovision, przy pomocy oprogramowania GelExpert 4.0 (NucleoTech).

IV. 10.5. Sekwencjonowanie

Sekwencjonowanie produktu RT-PCR prowadzono w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Nukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN z zastosowaniem zestawu DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kits firmy Amersham Pharmacia Biotech przy użyciu aparatu 377 DNA Sequencer firmy ABI PRISM. Otrzymane sekwencje nukleotydów porównywano z sekwencjami zawartymi w bazie danych NCBI z wykorzystaniem programu BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

IV. 11. Badanie stabilności mRNA kodującego SNAT3 w warunkach obniżonego pH

Aby odpowiedzieć na pytanie czy spadek mRNA kodującego SNAT3 wywołany obniżeniem pH medium do 6,5 spowodowany jest zmniejszeniem syntezy czy obniżeniem stabilności mRNA, komórki inkubowano przez 4 godziny z inhibitorem polimerazy RNA II - 5-6-dichloro-1- β -rybofuranozylobenzoimidazolem (DRB) o stężeniu 65 μ M (Sigma) [Hansen i wsp., 1996]. Następnie izolowano RNA i wykonywano reakcję RT-PCR. W tych warunkach wszelkie zmiany ekspresji odpowiadają zmianom stabilności mRNA.

IV. 12. Warunki stosowania czynników egzogennych

IV.12.1. Działanie inhibitora wymiennika Na^+/H^+ (HOE642) na komórki

Wpływ hamowania wymiennika Na^+/H^+ na ekspresję genów kodujących SNAT3 i GAPDH mierzono po 4-godzinnej inkubacji komórek linii glikoków C6 i

T98G z inhibitorem tego wymiennika – „cariporidem” HOE642 (10 μ M) (Aventis) w pożywce o pH standardowym (7,4) lub obniżonym do 6,5.

IV. 12.2. Działanie akrylamidu na komórki

Próbki RNA pochodziły z Department of Pediatrics and Kennedy Center, Vanderbilt University Medical Center (Nashville, Tennessee, USA). RNA pozyskano z hodowli pierwotnej astrocytów szczurów rasy Fischer 344 (Wu i wsp., 2005). Komórki inkubowano przez 6h w pożywce zawierającej akrylamid o stężeniu 0,1 mM i 1 mM.

IV. 12.3. Działanie inhibitora kinazy PI3K (LY294002) na komórki

Komórki linii glejaka T98G inkubowano przez 4h lub 24h w medium zawierającym inhibitor PI3K – LY294002 – 2- (4-morfolinylo)-8-fenyl-4H-1-benzopirany-4-on (w stężeniu 30 μ M w przypadku 4h inkubacji oraz 10, 20, 30 μ M w przypadku 24h inkubacji) (Sigma).

IV. 13. Wychwyty glutaminy przez komórki przy udziale poszczególnych układów

Komórki hodowli pierwotnej astrocytów; linii glejaka C6 oraz linii glejaka T98G (transformowane lub nietransformowane) preinkubowano przez 30 minut w 37°C w 0,25 ml medium inkubacyjnego (MI) zawierającego 150 mM NaCl; 3 mM KCl; 2 mM CaCl₂; 0,8 mM MgCl₂; 5 mM Glc oraz 10 mM HEPES. Po preinkubacji zmieniano medium na MI zawierające 0,25 μ Ci [³H] L-Gln oraz nieznakowaną Gln (0,156 mM, lub (w doświadczeniach kinetycznych) 0,156 - 10 mM) w objętości końcowej 0,25 ml. W przypadku doświadczeń kompetycyjnych stosowano 5mM roztwory aminokwasów lub swoistych inhibitorów transportu (32-krotny nadmiar). Komórki lizowano w 1 M NaOH przez 30 minut w 37°C. Układy transportujące Gln rozróżniano w następujący sposób:

- układ ASC: badając wychwyty w obecności MeAIB, His, Leu
- układ N: badając wychwyty w obecności MeAIB, Thr, Leu
- układ L: badając wychwyty w obecności MeAIB, Thr, His

Zawartość ^3H w lizatach mierzono w płynie scyntylicyjnym „Insta-Gel plus II” firmy Packard w liczniku scyntylicyjnym firmy Beckman. Kinetykę wychwytu obliczano w programie GraphPad Prism, 3.0.

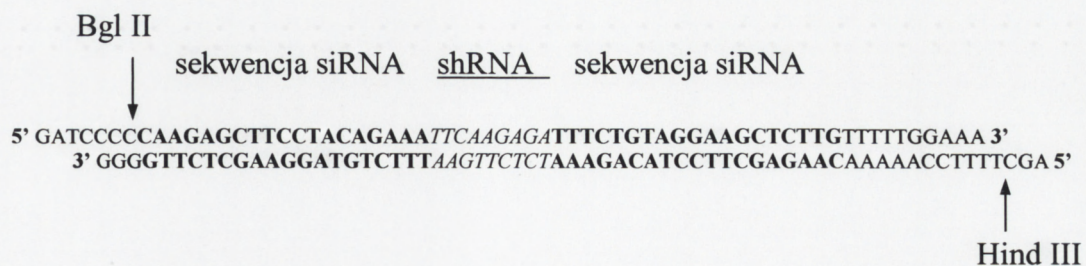
IV. 14. Oznaczanie białka

Białko oznaczano w lizatach komórek zawieszonych w 1 M NaOH metodą Bradford [1976] używając albuminy cielęcej jako standardu. 100 ml odczynnika Bradforda zawierało 10 mg barwnika Coomassie Brilliant Blue, 5 ml 96% etanolu i 10 ml 86% kwasu ortofosforowego. 270 μl tego odczynnika dodawano do 30 μl lizatu i mierzono ekstynkcję przy długości fali 595 nm w spektrofotometrze firmy BioRad.

IV. 15. Wyciszanie genu transportera SNAT3

IV. 15. 1. Klonowanie siRNA do plazmidu pSUPER

Syntezę siRNA wykonano na matrycy plazmidu pSUPER (Invitrogen) pod kontrolą promotora H1 polimerazy III [Brummelkamp i wsp., 2002]. Użyto sekwencji **ccaagagcuuccuacagaaa** siRNA (ang. *small interfering RNA*) skierowanej przeciwko mRNA kodującemu SNAT3 człowieka, korespondującej z nukleotydami 135-153 genu (gi: 40795668). Wykorzystano oligonukleotydy (Sigma) z generowanymi miejscami restrykcyjnymi dla enzymów Bgl II i Hind III (Fermentas) oraz z sekwencją tworzącą strukturę szpilki do włosów - shRNA (ang. *short hairpin RNA*) o następującej sekwencji:



shRNA rozpoznawana jest przez enzym DICER co prowadzi do degradacji całej sekwencji do siRNA.

Komplementarną sekwencję oligonukleotydów poddano hybrydyzacji w buforze zawierającym: 1 M Tris (pH 7,5); 5 M NaCl; 0,5 M EDTA w 65⁰C przez 10 minut, a następnie w temperaturze pokojowej przez 3h. W następnej kolejności przeprowadzono ligację. Mieszanina ligacyjna zawierała następujące składniki:

- plazmid pSUPER trawiony enzymami Bgl II i Hind III (50 ng) x μ l
- mix oligonukleotydów (250 μ M) 1 μ l
- bufor dla ligazy (10 x) 2 μ l
- ligaza T4 1 μ l
- H₂O do 20 μ l

Po zmieszaniu mieszaninę pozostawiono w temperaturze pokojowej na 1-3h, a następnie transformowano nią bakterie kompetentne.

IV. 15.2. Szczep bakteryjny i transformacja

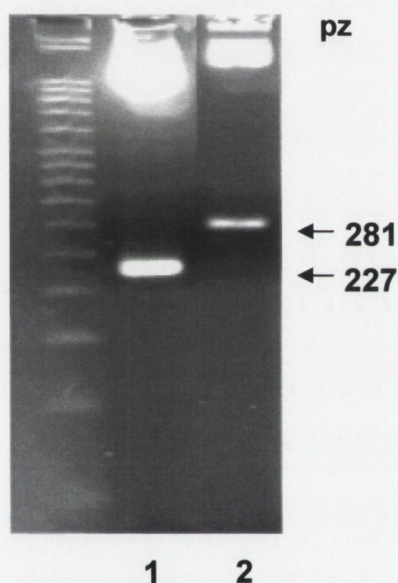
Do namnożenia rekombinowanego plazmidu używano szczepu *E. coli* o genotypie: F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG (Invitrogen), hodowanego na podłożu imMediaTM Amp Agar (Invitrogen). Transformację komórek kompetentnych przeprowadzano według przepisu producenta.

IV. 15.3. Izolacja DNA plazmidowego i analiza klonów

Płynne hodowle *E. coli* (200 ml lub 2 ml) hodowano przez 8h mieszając 300 rpm w podłożu imMediaTM Amp Liquid (Invitrogen) a następnie wirowano 6 000 x g przez 15 minut. Izolację DNA plazmidowego przeprowadzano przy użyciu gotowego zestawu odczynników i kolumniek firmy QIAGEN, według przepisu producenta. Stężenie plazmidowego DNA oceniano elektroforetycznie i spektrofotometrycznie. Izolację DNA plazmidowego w celu przeprowadzenia analizy klonów wykonywano metodą lizy alkalicznej. Osad bakterii zawieszano w roztworze zawierającym: 25 mM Tris-HCl, 50 mM glukozę, 10 mM EDTA, a po delikatnym wymieszaniu dodawano roztwór zawierający: 0,2 M NaOH, 1% SDS, a następnie 7,5 M octan potasu. Po wirowaniu 14 000 x g (5 min.) do supernatantu dodawano jedną objętość mieszaniny: fenol/chloroform/alkohol izoamylowy. Po 5 minutowym wirowaniu 14 000 x g do fazy wodnej dodawano jedną objętość

izopropanolu i poddawano ponownemu wirowaniu 14 000 x g. Osad przepłukiwano 70% alkoholem etylowym i wirowano przez 5 minut. Po osuszeniu osad zawieszano w 25 μ l wody destylowanej. DNA trawiono enzymami restrykcyjnymi EcoR I i Hind III (Fermentas). Rezultaty trawień analizowano w 2% żelu agarozowym. Wynik trawienia plazmidów: „pustego” oraz z wklonowaną wstawką przedstawia **Ryc. IV.1.**

Ryc. IV.1. Analiza restrykcyjna wektora pSUPER (1) i pSUPER – SNAT3 (2) trawionych enzymami restrykcyjnymi EcoR I i Hind III



IV. 15.4. Transfekcja linii glejaka T98G plazmidami rekombinowanymi

Konfluentną w 80% hodowlę linii glejaka T98G poddawano transfekcji plazmidami przy użyciu odczynnika LipofectamineTM 2000 Reagent (Invitrogen). Wydajność transfekcji wynosi około 60%. DNA z LipofectamineTM 2000 w medium Opti-MEM (GIBCO/BRL) inkubowano 30 minut w temperaturze pokojowej w proporcjach, które przedstawia **Tabela IV.2.** Mieszanie tę podawano komórkom na 6h. Transfekcję prowadzono w pożywce pozbawionej antybiotyków, a po 6h wymieniano pożywkę na medium z antybiotykami. Doświadczenia prowadzono po 48h od momentu transfekcji, każdorazowo wykonując jednocześnie reakcję RT-PCR, w celu sprawdzenia skuteczności metody siRNA.

Tabela IV.2. Warunki transfekcji z użyciem Lipofectamine™ 2000

Rodzaj płytki	DNA (μg)	Lipofectamine™ 2000 (μl)	Objętość mieszaniny z medium (μl)
24-studzienkowa	0,8	2	50
6-studzienkowa	4	10	250

IV. 16. Statystyczne opracowanie wyników

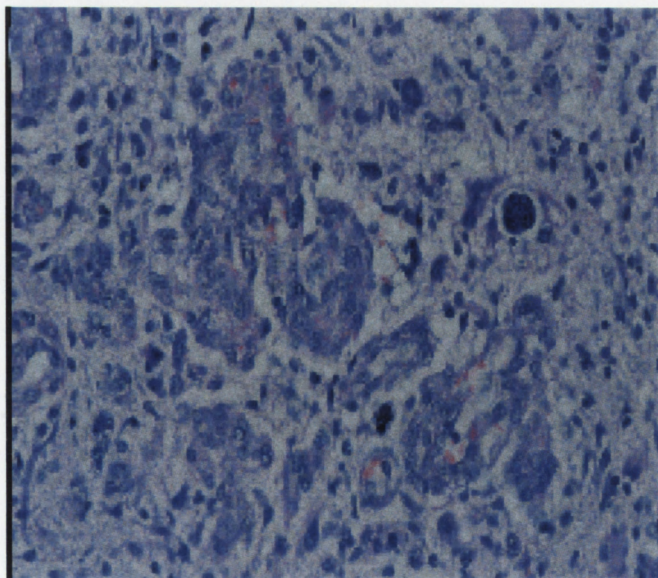
Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej arytmetycznej \pm odchylenie standardowe (SD). Liczbę doświadczeń przedstawiono w legendzie do Tabel lub Rycin. Znamienność statystyczną określano stosując test Mann-Whitney przy użyciu programu GraphPad Prism 3.0.

V. WYNIKI

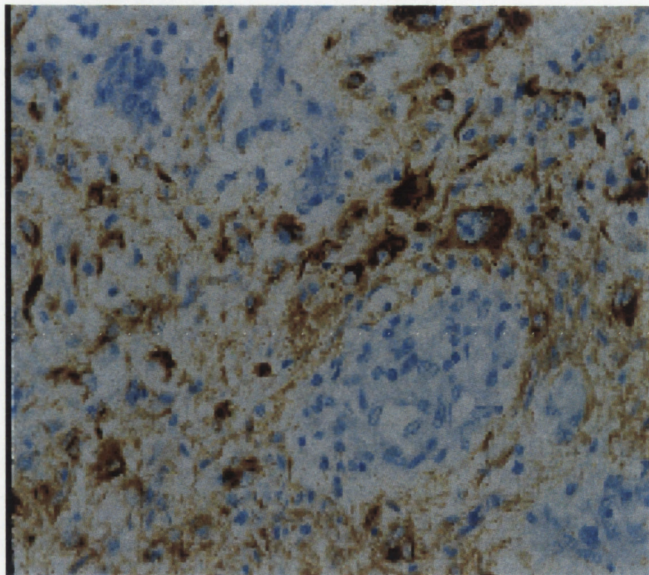
V. 1. Własności histologiczne i immunohistochemiczne *glioblastoma multiforme* (diagnostyka)

Materiał biopsyjny guzów pochodzenia glejowego poddano rutynowej diagnozie histologicznej (barwienie H&E) i immunohistochemicznej (GFAP, wimentyna) przy współpracy z Zakładem Neuropatologii Doświadczalnej i Klinicznej IMDiK PAN. Badaniami objęto guzy pochodzenia glejowego o IV stopniu złośliwości wg WHO - *glioblastoma multiforme* (GBM) oraz o III stopniu złośliwości wg WHO - *astrocytoma anaplasticum* (AA). **Ryc.V.1-3** przedstawiają typowy obraz mikroskopowy GBM, z cechami atypii jądrowej, polimorfizmem komórkowym, proliferacją mikronaczyń oraz ekspresją GFAP i wimentyny.

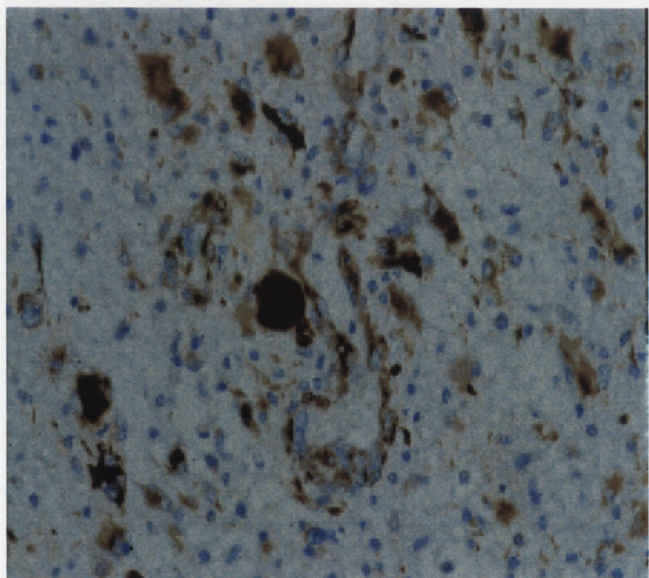
Ryc.V.1. GBM. Polimorfizm komórkowy, atypia jądrowa oraz proliferacja mikronaczyń, x 400



Ryc.V.2. GBM. Ekspresja GFAP, x 400



Ryc.V.3. GBM. Ekspresja wimentyny, x 400

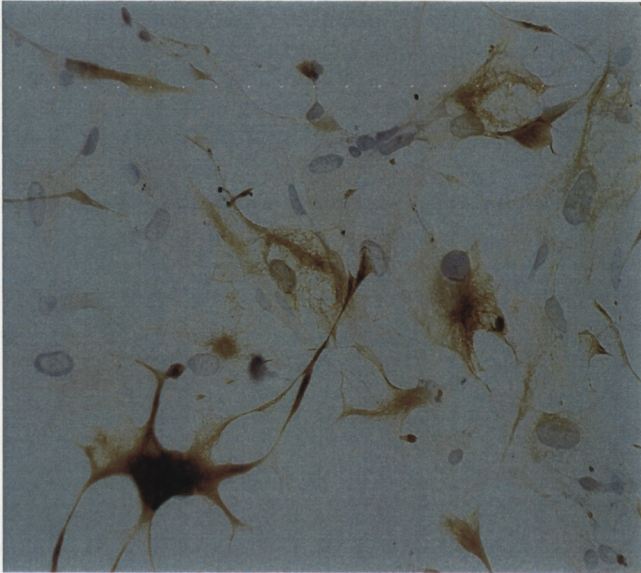


V. 2. Własności immunocytochemiczne hodowli pierwotnych wyprowadzonych z GBM i AA

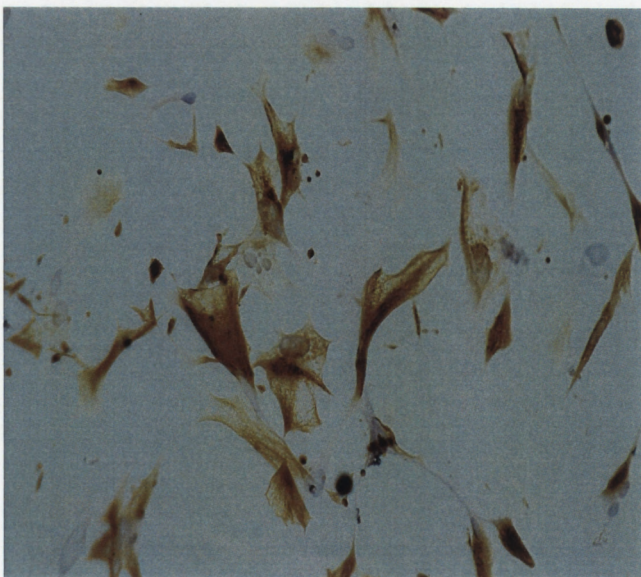
Hodowle pierwotne wyprowadzone z GBM i AA poddane zostały analizie immunocytochemicznej. Wykonano zatem barwienia analogiczne, jak w przypadku materiału biopsyjnego guzów pochodzenia glejowego, a także barwienia na obecność jądrowego antygenu proliferacyjnego Ki-67 (wykorzystano przeciwciało

MIB 1) obecnego w fazach cyklu G_1 , M, S, lecz nieobecnego w fazie G_0 . Hodowle wyprowadzone z glejaków wykazywały zróżnicowaną immunoreaktywność GFAP (**Ryc.V.4**), przy silnej ekspresji wimentyny (**Ryc.V.5**) i jądrowego Ki-67 (**Ryc.V.6**).

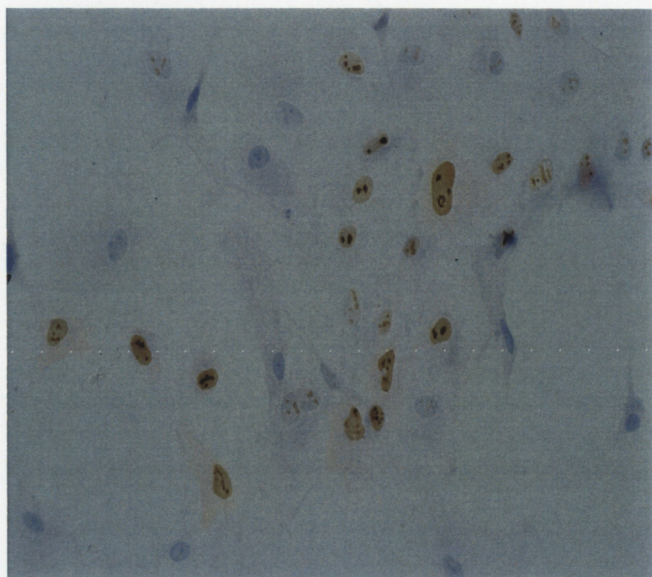
Ryc.V.4. Hodowle pierwotne wyprowadzone z GBM barwione na obecność GFAP. Obecne dobrze zróżnicowane komórki szeregu astroglejowego z silną ekspresją GFAP, x 400



Ryc.V.5. Hodowle pierwotne wyprowadzone z GBM barwione na obecność wimentyny, x 400



Ryc.V.6. Hodowle pierwotne wyprowadzone z GBM znakowane przeciwciałem MIB 1, x 400



V. 3. Ekspresja mRNA genów kodujących białka transportujące Gln: SNAT3, SNAT5, ASCT2, SNAT1

Analizie ekspresji mRNA genów kodujących białka transportujące Gln należące do układu N (SNAT3; SNAT5), układu ASC (ASCT2) i układu A (SNAT1) poddano guzy pochodzenia glejowego o III i IV stopniu złośliwości wg WHO (GBM i AA), przerzuty do OUN wywodzące się z nowotworów narządów obwodowych i hodowle pierwotne wyprowadzone z glejaków. W przypadku transportera SNAT3 zbadano ponadto ekspresję mRNA w guzie o II stopniu złośliwości wg WHO.

Ekspresja mRNA genów kodujących transportery SNAT3 i ASCT2 w guzach pochodzenia glejowego o wysokim stopniu złośliwości: GBM i AA była odpowiednio trzykrotnie i ponad dwukrotnie podwyższona w stosunku do tkanki kontrolnej. Nie wykazano zmian ekspresji mRNA genów kodujących SNAT1 i SNAT5 w glejakach złośliwych w porównaniu z kontrolą (**Ryc.V.7**).

Analizie ekspresji mRNA kodującego SNAT3 poddano inny przypadek guza OUN –*oligodendroglioma*, o II stopniu złośliwości wg WHO. W guzie tym nie wykazano zmian ekspresji mRNA dla tego transportera (**Ryc.V.8**).

Ekspresja mRNA genu kodującego SNAT3 w przerzutach nie wykazywała różnic istotnych statystycznie w stosunku do tkanki kontrolnej. Natomiast w

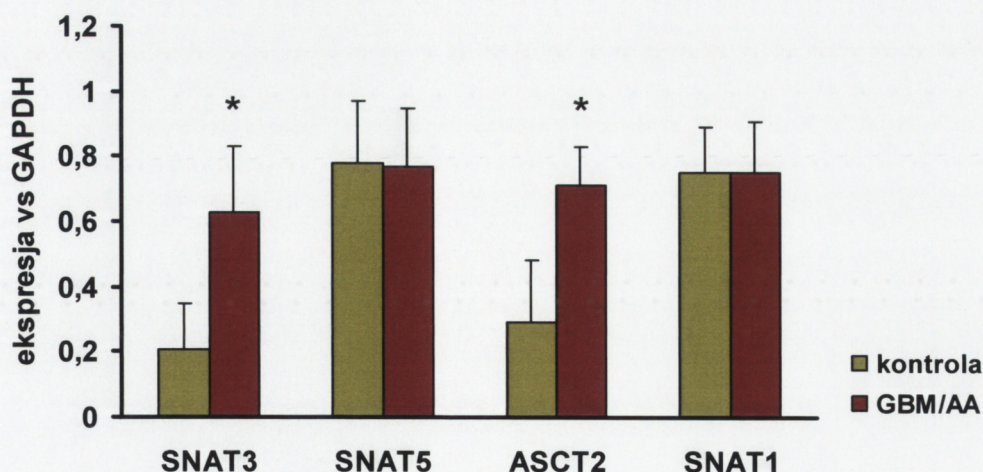
przypadku transportera SNAT5 stwierdzono obniżenie, a w przypadku transportera ASCT2 2,5-krotne zwiększenie ekspresji w porównaniu z kontrolą (**Ryc.V.9**).

Ekspresja mRNA genów kodujących SNAT3 i SNAT5 w hodowlach wyprowadzonych z guzów pochodzenia glejowego była wyraźnie obniżona w stosunku do tych guzów. Najsilniejszy spadek obserwowano w przypadku SNAT3, gdzie w trzech spośród dziewięciu badanych hodowli stwierdzono nawet całkowity zanik ekspresji mRNA dla tego transportera. W przypadku mRNA kodującego ASCT2 i SNAT1 w hodowli wyprowadzonej z GBM i AA nie stwierdzono różnic w ekspresji w stosunku do guzów pierwotnych (**Ryc.V.11**).

Elektroforetyczny rozdział na żelu agarozowym produktów RT-PCR mRNA dla transporterów: SNAT3 (578 pz); SNAT5 (303 pz); ASCT2 (507 pz); SNAT1 (479 pz) w kontroli, glejakach i przerzutach (w przypadku transportera SNAT3) przedstawia **Ryc.V.10**.

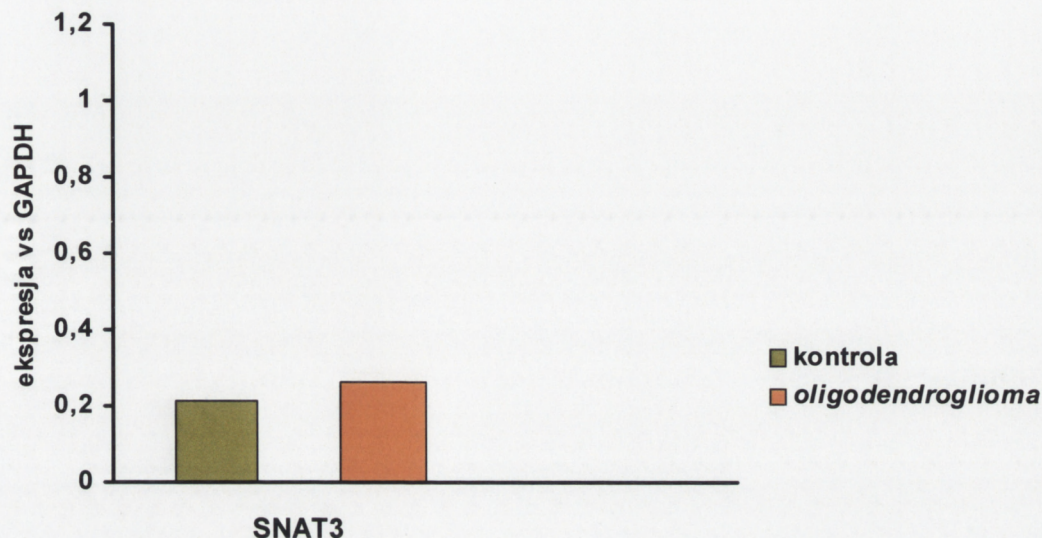
Elektroforetyczny rozdział na żelu agarozowym produktów RT-PCR mRNA dla transporterów: SNAT3; SNAT5; ASCT2 oraz SNAT1 w glejakach złośliwych i w wyprowadzonych z nich hodowlach przedstawia **Ryc.V.12**.

Ryc.V.7. Ekspresja mRNA genów kodujących białka transporterowe: SNAT3; SNAT5; ASCT2; SNAT1 w guzach pochodzenia glejowego o wysokim stopniu złośliwości (GBM i AA) oraz w kontroli mierzona stosunkiem intensywności produktu reakcji RT-PCR badanego białka do genu białka GAPDH



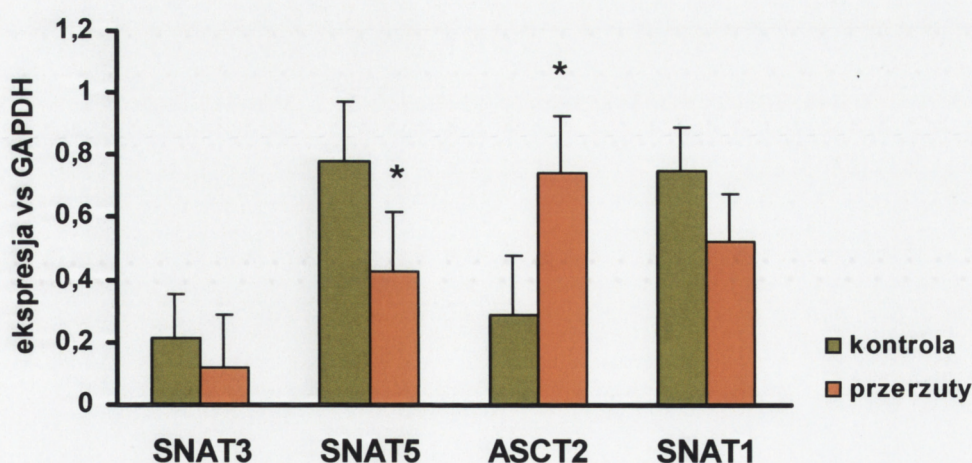
Wykorzystano 10 różnych kontroli oraz w sumie 17 przypadków GBM i AA. Z każdej tkanki wykonano po 3 niezależne izolacje. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli (Mann-Whitney test).

Ryc.V.8. Ekspresja mRNA genu kodującego transporter SNAT3 w *oligodendrogloma* o II stopniu złośliwości wg WHO oraz w kontroli mierzona stosunkiem intensywności produktu reakcji RT-PCR badanego białka do genu białka GAPDH



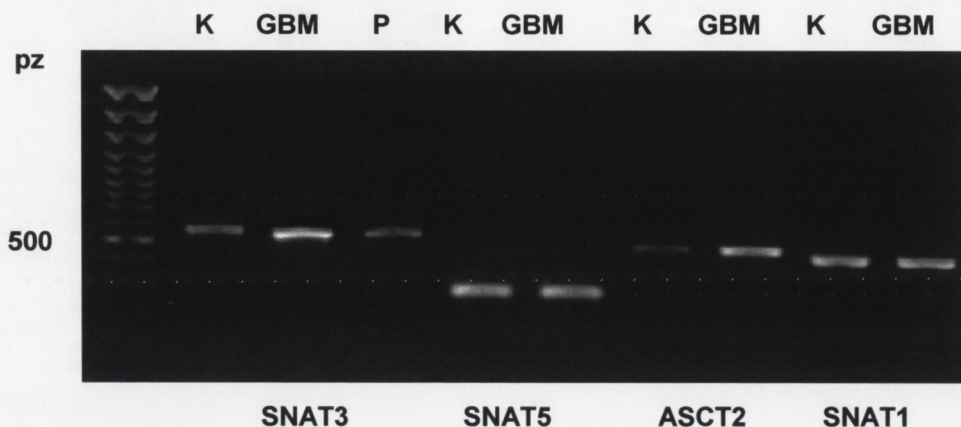
Wykorzystano 10 różnych kontroli oraz pojedynczy przypadek oligodendrogloma. Z każdej tkanki wykonano po 3 niezależne izolacje. Wyniki przedstawiono jako średnią.

Ryc.V.9. Ekspresja mRNA genów kodujących białka transporterowe: SNAT3; SNAT5; ASCT2; SNAT1 w przerzutach wywodzących się z nowotworów narządów obwodowych oraz w kontroli mierzona stosunkiem intensywności produktu reakcji RT-PCR badanego białka do genu białka GAPDH

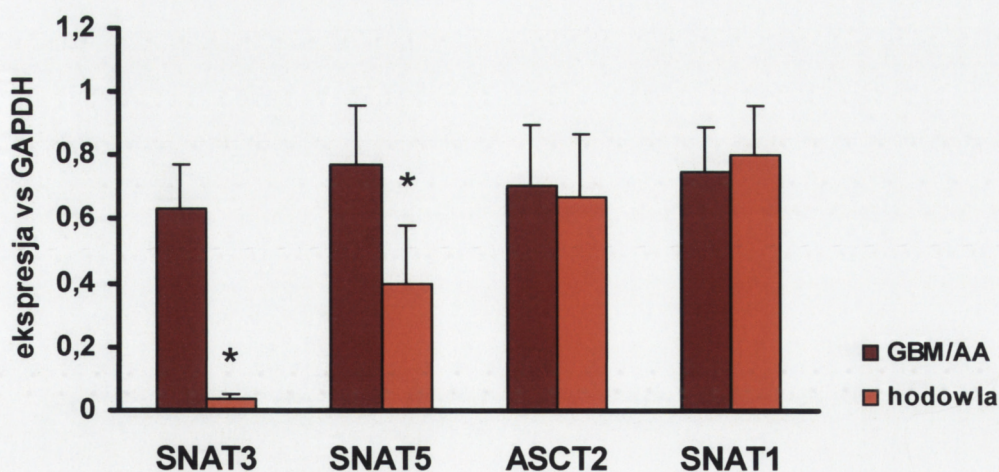


Wykorzystano 10 różnych kontroli oraz w sumie 6 przypadków przerzutów. Z każdej tkanki wykonano po 3 niezależne izolacje. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli (Mann-Whitney test).

Ryc.V.10. Analiza ekspresji mRNA genów kodujących białka transporterowe: SNAT3; SNAT5; ASCT2; SNAT1 w kontroli (K), w glioblastoma (GBM) oraz w przerzutach (P)

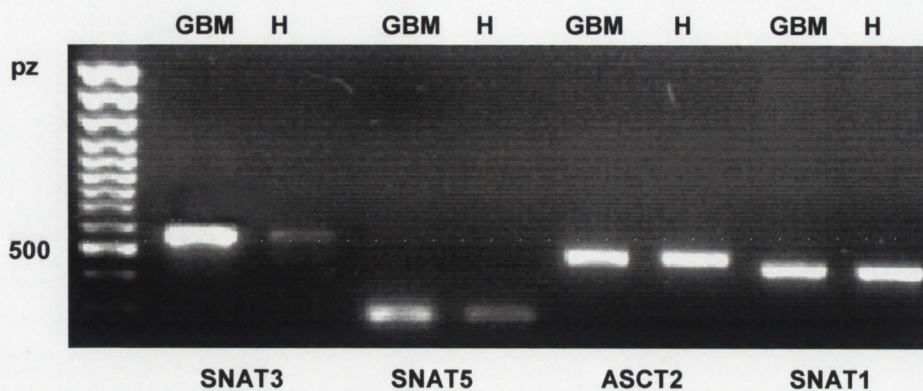


Ryc.V.11. Ekspresja mRNA genów kodujących białka transporterowe: SNAT3; SNAT5; ASCT2; SNAT1 w guzach pochodzenia glejowego o wysokim stopniu złośliwości (GBM i AA) oraz w hodowlach wyprowadzonych z tych guzów mierzona stosunkiem intensywności produktu reakcji RT-PCR badanego białka do genu białka GAPDH



Wykorzystano w sumie 12 różnych przypadków GBM i AA oraz 9 hodowli wyprowadzonych z tych guzów. Z każdej tkanki wykonano po 3 niezależne izolacje. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD. * $p < 0,05$ w stosunku do GBM/AA (Mann-Whitney test).

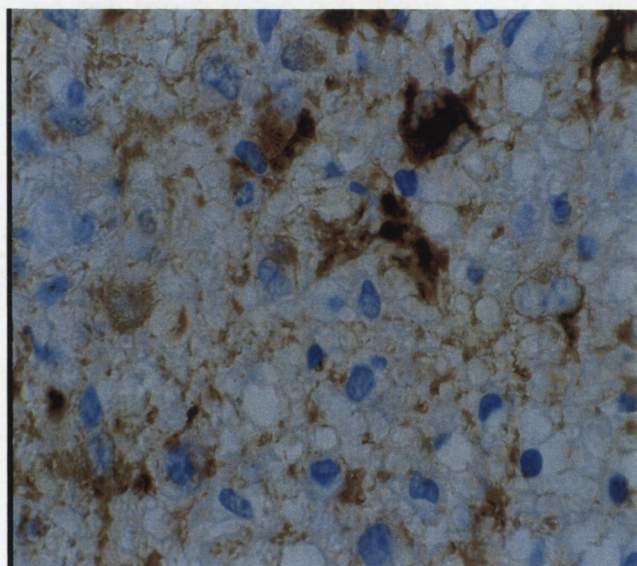
Ryc.V.12. Analiza ekspresji mRNA genów kodujących białka transporterowe: SNAT3; SNAT5; ASCT2; SNAT1 w glioblastoma (GBM) oraz w hodowli wyprowadzonej z GBM (H)



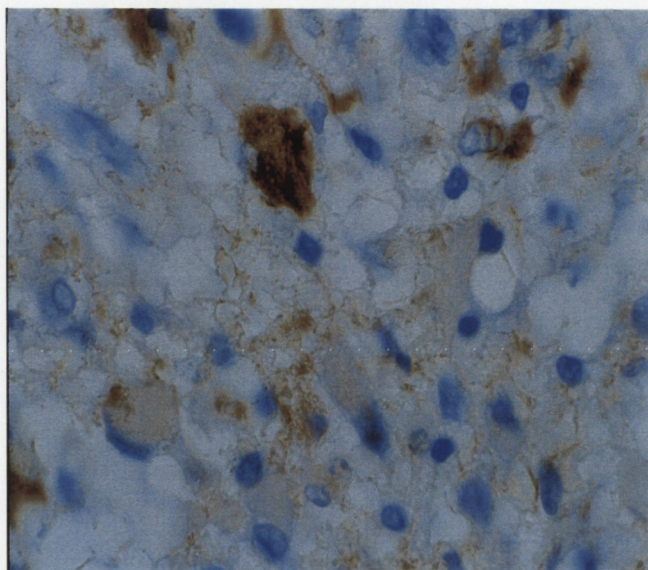
V. 4. Immunohistochemia SNAT3 w GBM

Wycinki GBM poddano barwieniu immunohistochemicznemu na obecność SNAT3. Zaobserwowano silną ekspresję białka w błonach komórkowych (**Ryc.V.13**), w cytoplazmie w pojedynczych komórkach nowotworowych (**Ryc.V.14**) oraz w komórkach śródbłonka (**Ryc.V.15**).

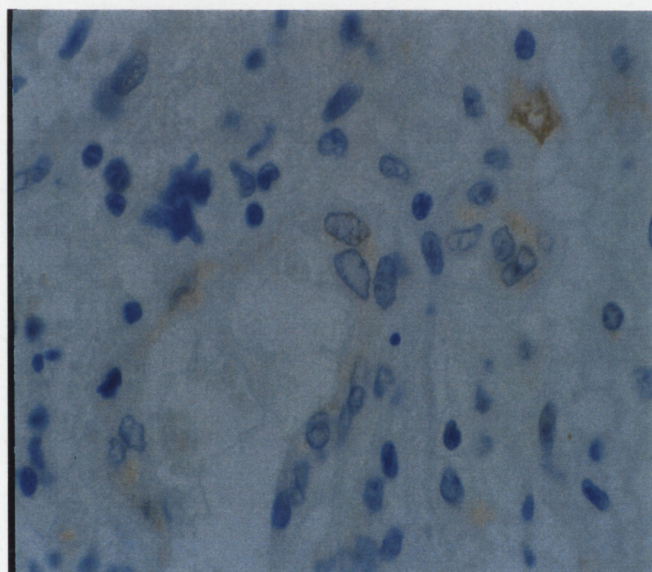
Ryc.V.13. Immunoreaktywność SNAT3 w błonach komórkowych i cytoplazmie, x 1000



Ryc.V.14. Immunoreaktywność SNAT3 w cytoplazmie w pojedynczych komórkach nowotworowych, x 1000



Ryc.V.15. Immunoreaktywność SNAT3 w komórkach śródbłonka, x 1000

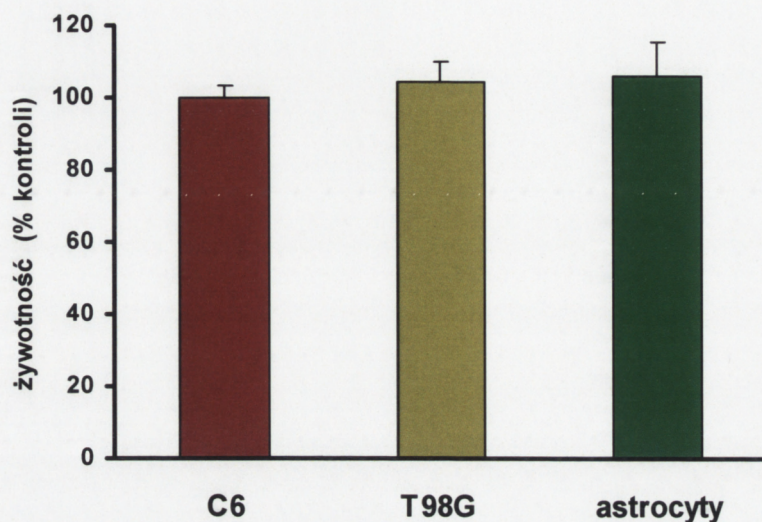


V. 5. Wpływ obniżenia pH medium hodowlanego na różne własności komórek

V. 5.1. Żywotność komórek linii glejaków C6, T98G oraz hodowli pierwotnej astrocytów

Inkubacja w medium hodowlanym o pH obniżonym do 6,5 przez 4h nie wpływała na przeżywalność komórek w żadnym spośród badanych typów komórek: w liniach glejaków C6, T98G ani w hodowli pierwotnej astrocytów (**Ryc.V.16**).

Ryc.V.16. Żywotność komórek (test MTT) po 4h inkubacji w medium o obniżonym pH w linii glejaka C6, linii glejaka T98G oraz w hodowli pierwotnej astrocytów

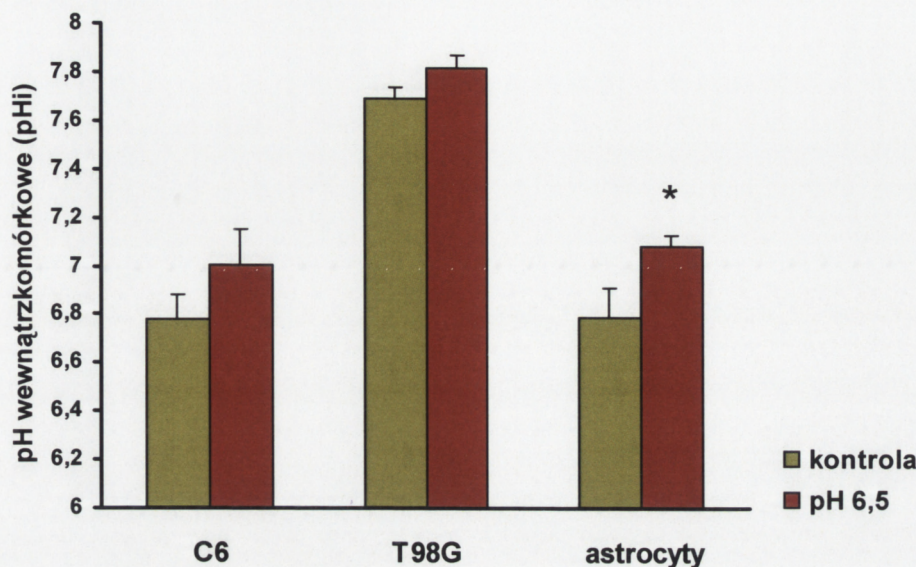


Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych doświadczeń \pm SD.

V. 5.2. Pomiar wewnątrzkomórkowego pH (pHi) komórek linii glejaków C6, T98G oraz hodowli pierwotnej astrocytów

Pomiarowi wewnątrzkomórkowego pH (pHi) po obniżeniu pH medium hodowlanego poddano linię glejaka szczurzego C6, linię glejaka ludzkiego T98G oraz hodowlę pierwotną astrocytów. W badanych liniach nowotworowych zarysowała się statystycznie nieznamienna tendencja do wzrostu pH wewnątrzkomórkowego. Efekt ten był znamieny statystycznie w przypadku hodowli pierwotnej astrocytów, gdzie obserwowano wzrost pHi z 6,79 do 7,07. W linii glejaka T98G zwraca uwagę najwyższe pH wewnątrzkomórkowe w porównaniu z linią glejaka C6 oraz hodowlą pierwotną astrocytów (Ryc.V.17).

Ryc.V.17. Wpływ 4h inkubacji w medium o obniżonym pH na pH wewnątrzkomórkowe w linii glejaka C6, linii glejaka T98G oraz w hodowli pierwotnej astrocytów



Wyniki przedstawiono jako średnią z 3-6 niezależnych doświadczeń \pm SD. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli (inkubacja w pożywce o pH standardowym) (Mann-Whitney test).

V. 5.3. Ekspresja mRNA genów kodujących białka transportujące Gln: SNAT3, SNAT5, ASCT2, SNAT1 po obniżeniu pH medium hodowlanego komórek linii glejaków C6, T98G oraz hodowli pierwotnej astrocytów

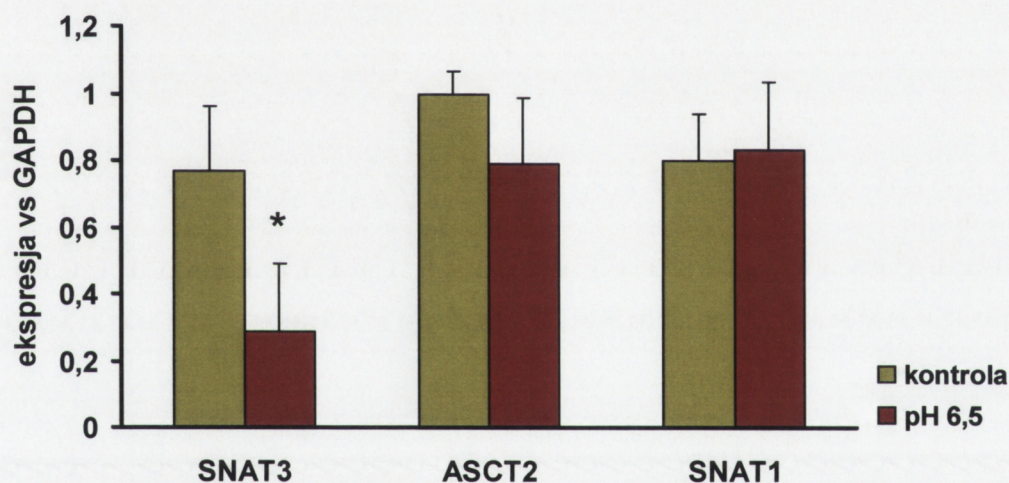
We wszystkich analizowanych liniach komórkowych zbadano poziom ekspresji mRNA genów kodujących białka transportujące Gln: SNAT3, ASCT2 i SNAT1 po zakwaszeniu medium. W przypadku linii glejaka T98G zbadano ponadto ekspresję mRNA kodującego SNAT5.

Ekspresja mRNA genu kodującego SNAT3 ulegała selektywnemu i znamiennemu statystycznie obniżeniu po 4h inkubacji w medium o pH obniżonym do 6,5 w stosunku do inkubacji w medium standardowym (pH 7,4). Zjawisko to stwierdzono we wszystkich badanych typach komórek. W przypadku linii glejaka C6 był to spadek ponad 2,5-krotny, w przypadku linii glejaka ludzkiego T98G i hodowli pierwotnej astrocytów około 2-krotny. Ekspresja mRNA kodującego zarówno SNAT1, jak i ASCT2 nie ulegała zmianom istotnym statystycznie w tych samych warunkach doświadczalnych w żadnym spośród badanych typów komórek (Ryc.V.18, Ryc.V.20, Ryc.V.22). Podobnie nie stwierdzono zmian w ekspresji

mRNA kodującego SNAT5 podczas inkubacji w pożywce o obniżonym pH w linii glejaka T98G (**Ryc.V.20**). Dodatkowa 4-godzinna inkubacja w pożywce o standardowym pH znosiła efekt obniżenia ekspresji mRNA kodującego SNAT3 w linii glejaka szczurzego C6 (**Ryc.V.24**).

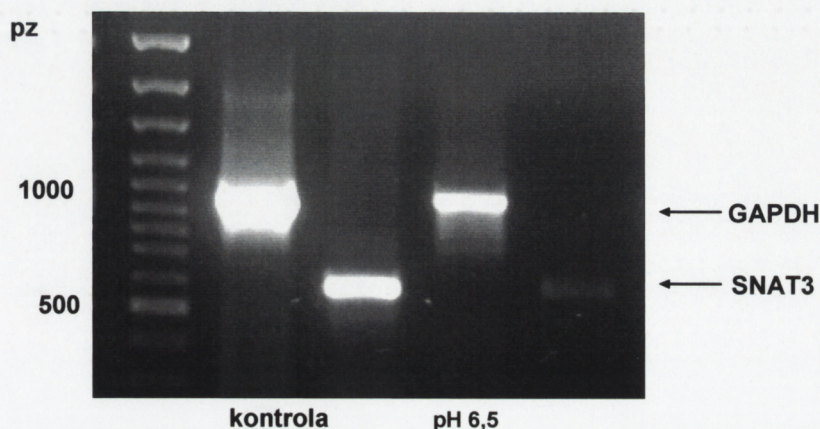
Elektroforetyczny rozdział na żelu agarozowym produktów RT-PCR mRNA dla transportera SNAT3 (578 pz) i GAPDH (998 pz) w warunkach kontrolnych i w zmienionym pH przedstawia w linii glejaka C6 - **Ryc.V.19**, w linii glejaka T98G - **Ryc.V.21**, a w hodowli pierwotnej astrocytów - **Ryc.V.23**.

Ryc.V.18. Ekspresja mRNA kodującego białka transporterowe: SNAT3, ASCT2, SNAT1 po 4h inkubacji w medium o obniżonym pH w linii glejaka C6 mierzona stosunkiem intensywności produktu reakcji RT-PCR badanego białka do genu białka GAPDH

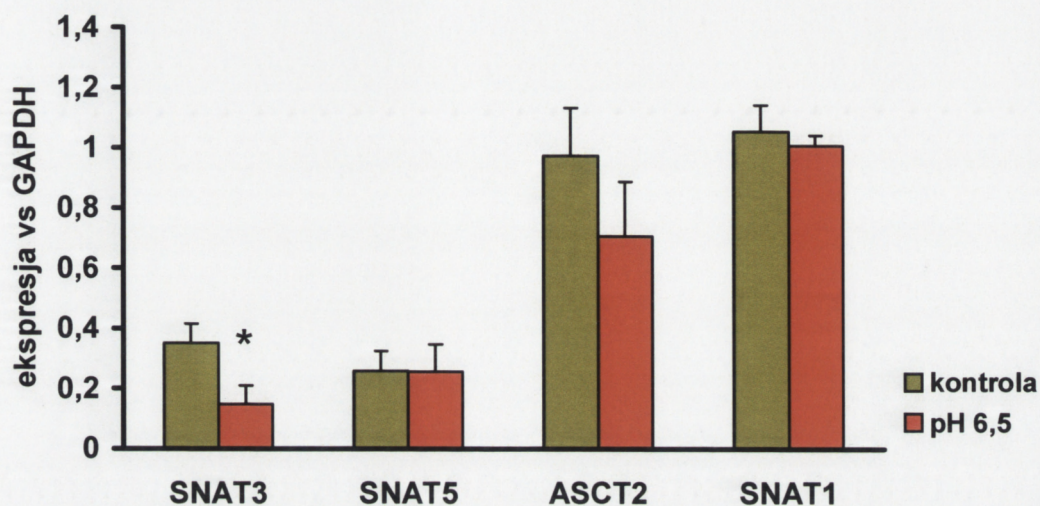


Wyniki przedstawiono jako średnią z 3 - 8 niezależnych doświadczeń \pm SD. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli (inkubacji w pożywce o pH standardowym) (Mann-Whitney test).

Ryc.V.19. Analiza ekspresji mRNA genu kodującego białko transporterowe SNAT3 oraz białko GAPDH po 4h inkubacji w medium o obniżonym pH i w pożywce standardowej w linii glejaka C6

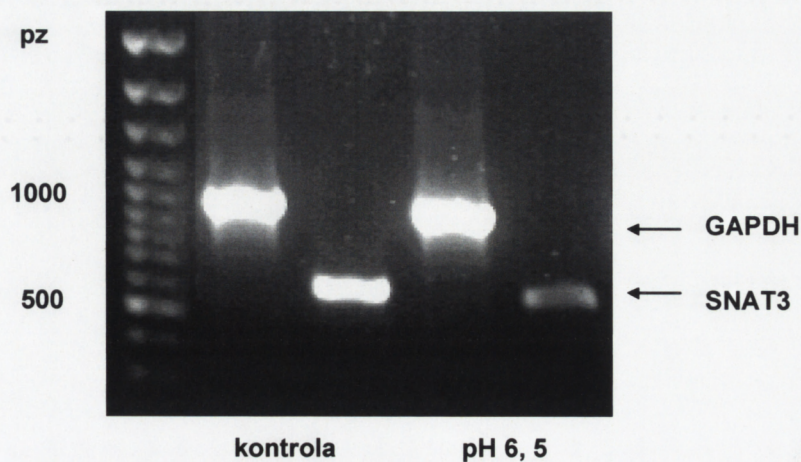


Ryc.V.20. Ekspresja mRNA kodującego białko transporterowe: SNAT3, SNAT5, ASCT2, SNAT1 po 4h inkubacji w medium o obniżonym pH w linii glejaka T98G mierzona stosunkiem intensywności produktu reakcji RT-PCR badanego białka do genu białka GAPDH

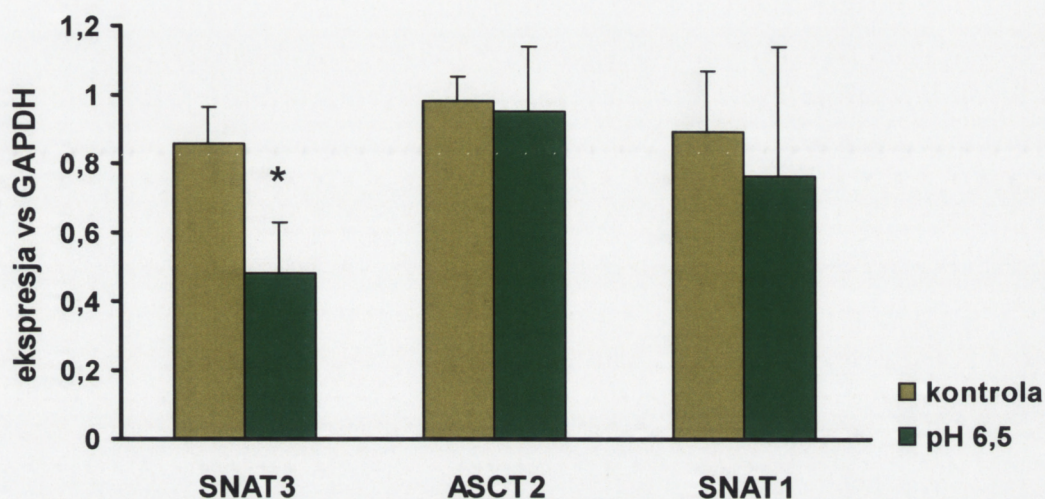


Wyniki przedstawiono jako średnią z 4 niezależnych doświadczeń \pm SD. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli (inkubacja w pożywce o pH standardowym) (Mann-Whitney test).

Ryc.V.21. Analiza ekspresji mRNA genu kodującego białko transporterowe SNAT3 oraz białko GAPDH po 4h inkubacji w medium o obniżonym pH i w pożywce standardowej w linii glejaka T98G

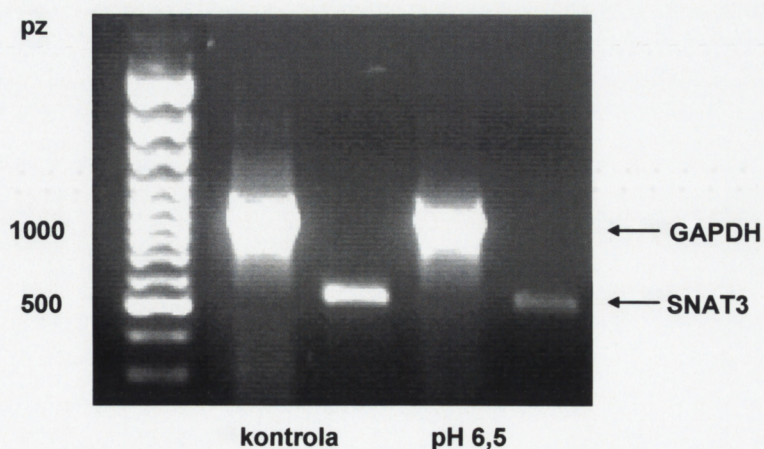


Ryc.V.22. Ekspresja mRNA kodującego białka transporterowe: SNAT3, ASCT2, SNAT1 po 4h inkubacji w medium o obniżonym pH w hodowli pierwotnej astrocytów mierzona stosunkiem intensywności produktu reakcji RT-PCR badanego białka do genu białka GAPDH

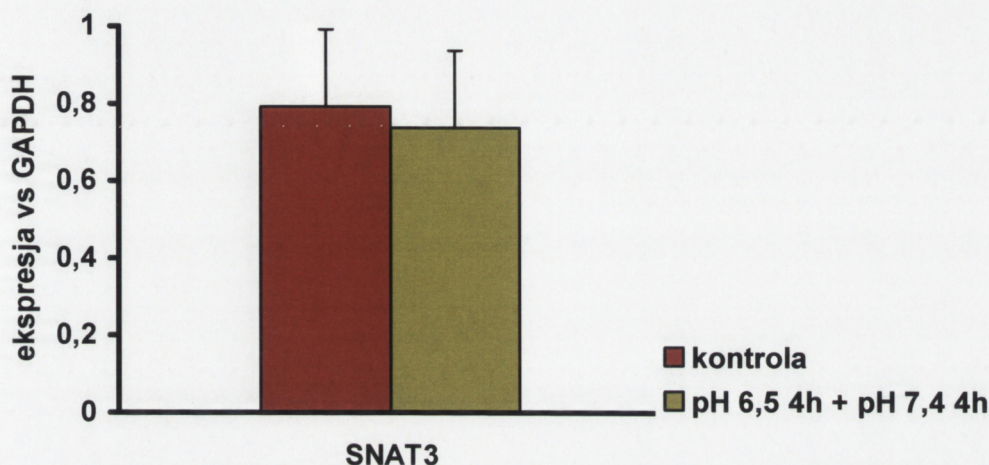


Wyniki przedstawiono jako średnią z 4 niezależnych doświadczeń \pm SD. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli (inkubacja w pożywce o pH standardowym) (Mann-Whitney test).

Ryc.V.23. Analiza ekspresji mRNA genu kodującego białko transporterowe SNAT3 oraz białko GAPDH po 4h inkubacji w medium o obniżonym pH i w pożywce standardowej w hodowli pierwotnej astrocytów



Ryc.V.24. Ekspresja mRNA kodującego białko transporterowe SNAT3 po 4h inkubacji w medium o obniżonym pH a następnie 4h inkubacji w medium o pH 7, 4 w linii glejaka C6 mierzona stosunkiem intensywności produktu reakcji RT-PCR badanego białka do genu białka GAPDH

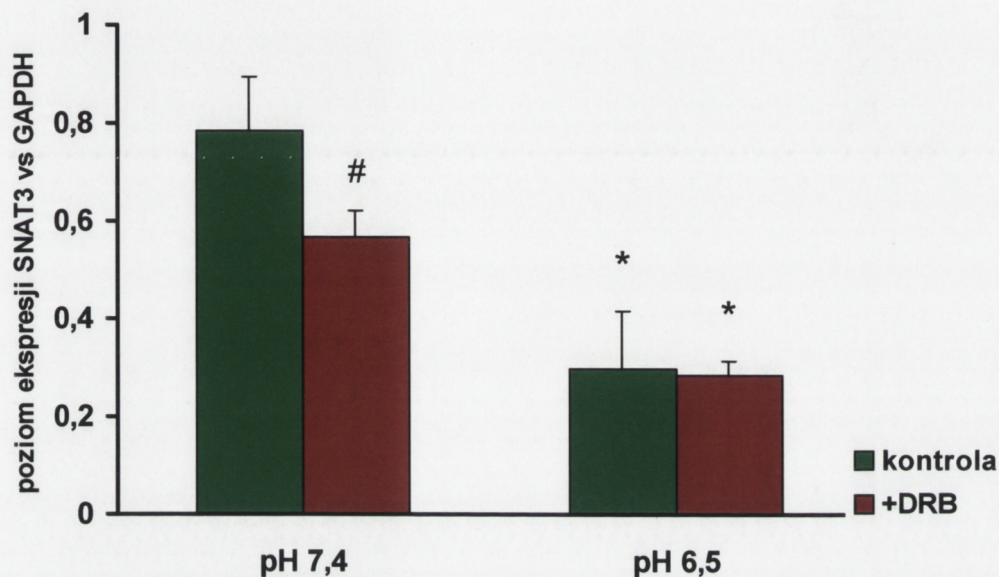


Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych doświadczeń \pm SD.

V. 5.4. Ocena stabilności mRNA genu kodującego SNAT3 w linii glejaka C6

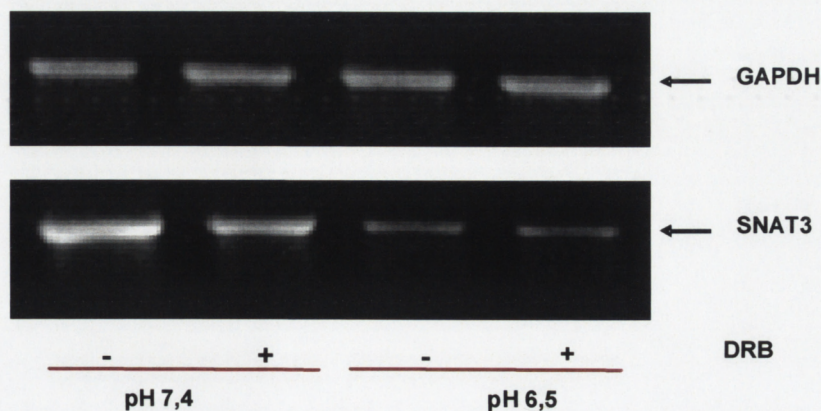
Analizie stabilności mRNA genu kodującego SNAT3 w medium o obniżonym pH poddano linię glejaka C6. Użyto w tym celu specyficznego inhibitora procesu transkrypcji - 5-6-dichloro-1- β -rybofuranozylobenzoimidazolu (DRB) w stężeniu 65 μ M. Zaobserwowano znamiennej statystycznie spadek ekspresji mRNA kodującego SNAT3 podczas 4-godzinnej inkubacji w medium o pH standardowym w obecności inhibitora transkrypcji. W medium o pH obniżonym do 6,5 poziom ekspresji mRNA kodującego SNAT3 ulegał ponad 2,5-krotnemu obniżeniu po 4-godzinnej inkubacji, zarówno w obecności, jak i pod nieobecność DRB. W obu przypadkach były to zmiany znamiennej statystycznie. Wynik ten świadczyć może o tym, że obniżenie mRNA w warunkach niskiego pH wiąże się głównie, jeśli nie wyłącznie ze spadkiem jego stabilności (Ryc.V.25-26).

Ryc.V.25. Ekspresja mRNA genu kodującego białko transporterowe SNAT3 w linii glejaka C6 po inkubacji w medium o obniżonym pH bądź w pożywce standardowej w obecności lub pod nieobecność inhibitora polimerazy RNA II (DRB), mierzona stosunkiem intensywności produktu reakcji RT-PCR badanego białka do genu białka GAPDH



Wyniki przedstawiono jako średnią z 3 niezależnych doświadczeń \pm SD. [#] $p < 0,05$ w stosunku do kontroli, ^{*} $p < 0,05$ w stosunku do inkubacji w pH 7,4 (Mann-Whitney test).

Ryc.V.26. Analiza ekspresji mRNA genu kodującego białko transporterowe SNAT3 oraz białko GAPDH w linii glejaka szczurzego C6 po inkubacji w medium o obniżonym pH bądź w pożywce standardowej w obecności lub pod nieobecność inhibitora polimerazy RNA II (DRB)

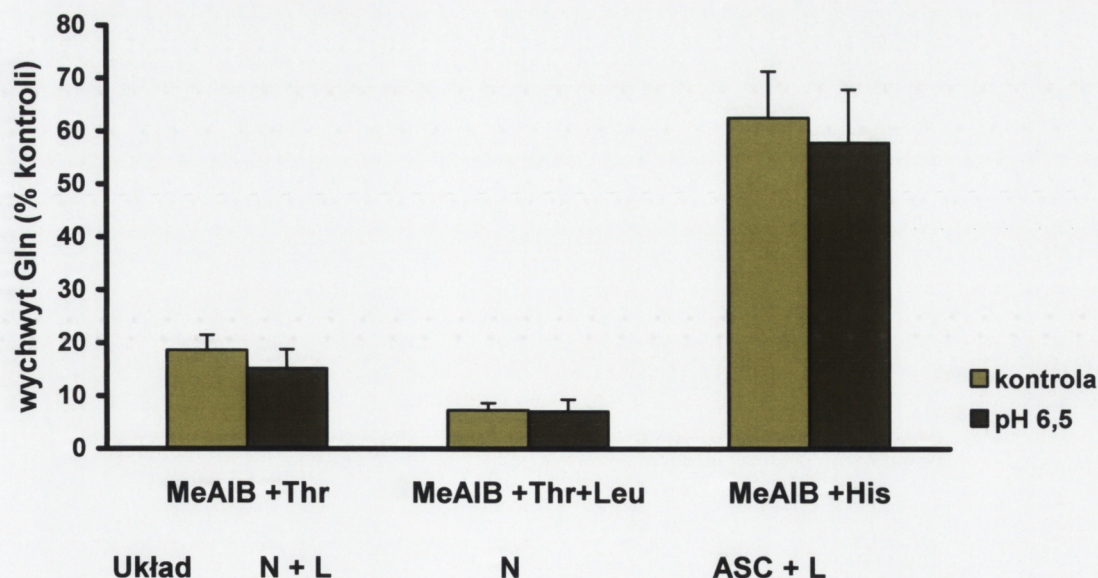


V. 5.5. Wychwył Gln przez komórki linii glejaków C6, T98G oraz hodowli pierwotnej astrocytów

Przeprowadzono analizę wychwył Gln przez komórki linii glejaka C6, linii glejaka T98G oraz komórki hodowli pierwotnych astrocytów po 4-godzinnym hodowaniu w pożywce o standardowym i obniżonym pH.

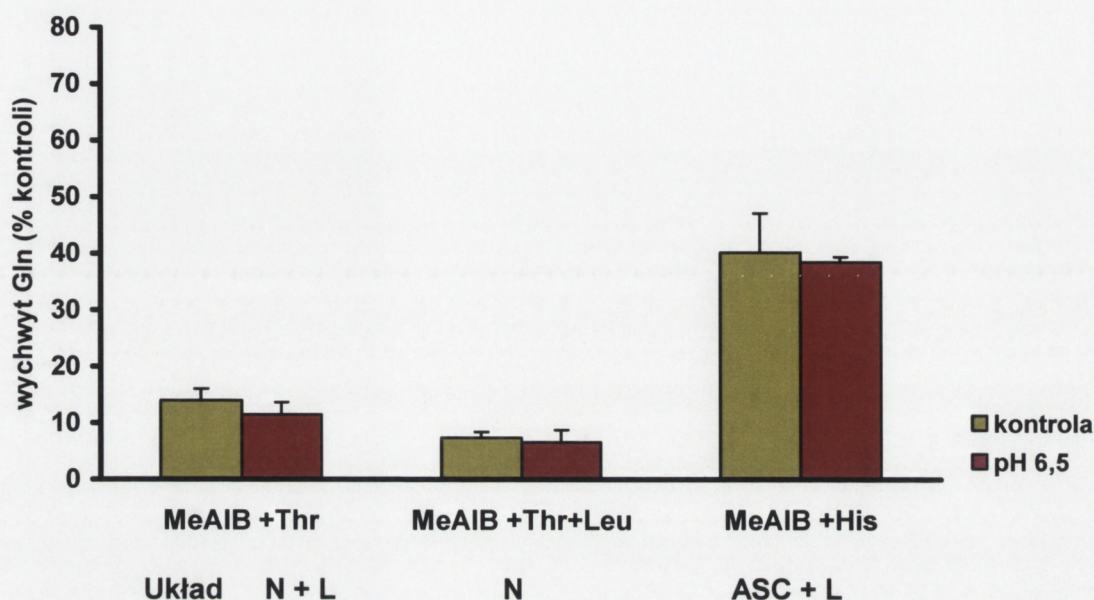
We wszystkich badanych typach komórek dominował wychwył Gln z udziałem układu ASC. Największy udział tego układu w wychwył Gln zaobserwowano w linii glejaka C6 (około 62% wychwył całkowitego). W przypadku linii glejaka T98G i hodowli pierwotnej udział ten wynosił około 40%. Układ N w nieznacznym stopniu uczestniczył w pobieraniu glutaminy we wszystkich badanych typach komórek. W obu liniach glejaka odpowiadał on za około 7%, a w hodowli pierwotnej astrocytów za około 18% wychwył całkowitego. Obniżenie pH (4h) medium hodowlanego do 6,5 nie miało wpływu na wychwył całkowity, ani na udział poszczególnych układów w wychwył Gln w żadnym spośród badanych typów komórek (Ryc.V.27-29).

Ryc.V.27. Wychwył Gln przez komórki linii glejaka C6 po 4h inkubacji w medium o obniżonym pH i w pożywce standardowej (kontrola) mierzony w obecności inhibitorów poszczególnych układów: MeAIB i Thr (aktywne układy N i L); MeAIB, Thr, Leu (aktywne układ N); MeAIB, His (aktywne układy ASC i L)



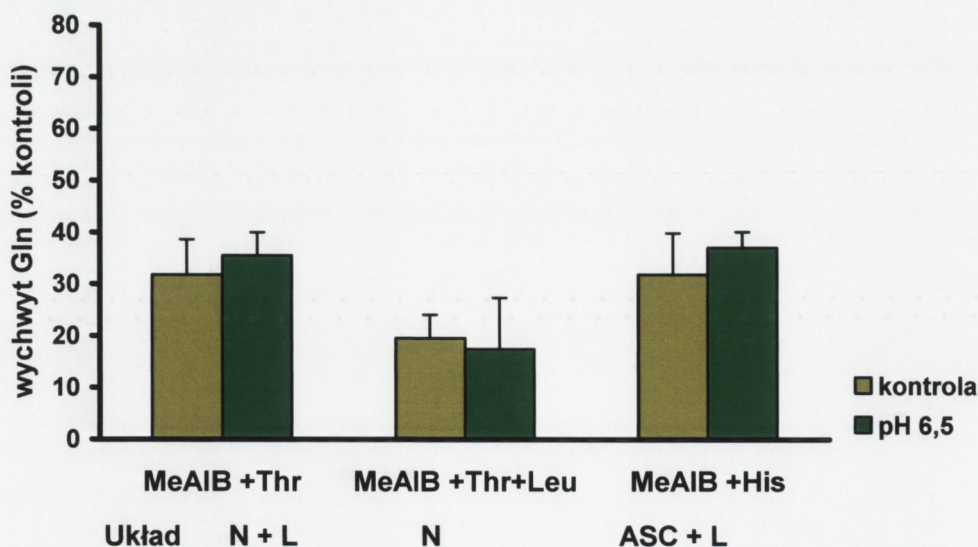
Wyniki przedstawiono jako średnią z 3 niezależnych doświadczeń \pm SD.

Ryc.V.28. Wychwył Gln przez komórki linii glejaka T98G po 4h inkubacji w medium o obniżonym pH i w pożywce standardowej (kontrola) mierzony w obecności inhibitorów poszczególnych układów: MeAIB i Thr (aktywne układy N i L); MeAIB, Thr, Leu (aktywny układ N); MeAIB, His (aktywne układy ASC i L)



Wyniki przedstawiono jako średnią z 3 niezależnych doświadczeń \pm SD.

Ryc.V.29. Wychwył Gln przez komórki hodowli pierwotnej astrocytów po 4h inkubacji w medium o obniżonym pH i w pożywce standardowej (kontrola) mierzony w obecności inhibitorów poszczególnych układów: MeAIB i Thr (aktywne układy N i L); MeAIB, Thr, Leu (aktywny układ N); MeAIB, His (aktywne układy ASC i L)



Wyniki przedstawiono jako średnią z 3 niezależnych doświadczeń \pm SD.

Parametry kinetyki wychwytu glutaminy (V_{\max} i K_m) nie ulegały istotnym statystycznie zmianom w wyniku hodowania w pożywce o obniżonym pH. Obserwacja ta dotyczyła zarówno linii glejaka C6 (**Tabela V.1**), jak i hodowli pierwotnej astrocytów (**Tabela V.2**).

Tabela V.1. Analiza kinetyczna wychwytu Gln przez komórki linii glejaka C6 w warunkach obniżonego pH

Wychwyt	V_{\max} (nmol/min/mg białka)	K_m (mM)
całkowity pH 7,4	3,36 ± 0,11	1,49 ± 0,07
całkowity pH 6,5	3,32 ± 0,1	1,64 ± 0,09
przez układ N pH 7,4	1,33 ± 0,05	0,69 ± 0,07
przez układ N pH 6,5	1,03 ± 0,06	0,58 ± 0,06

Wyniki przedstawiono jako średnią z 3 niezależnych doświadczeń ± SD.

Tabela V.2. Analiza kinetyczna wychwytu Gln przez komórki hodowli pierwotnej astrocytów w warunkach obniżonego pH

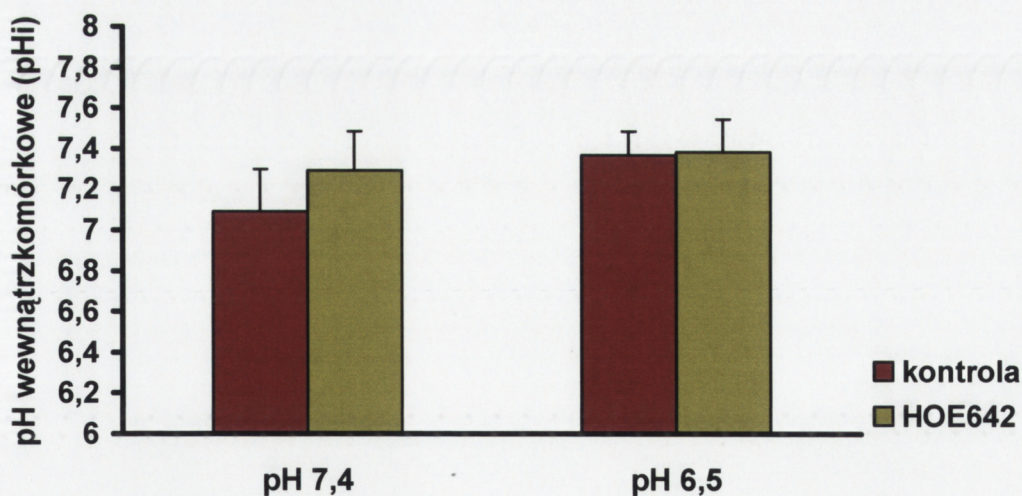
Wychwyt	V_{\max} (nmol/min/mg białka)	K_m (mM)
całkowity pH 7,4	2,94 ± 0,12	0,23 ± 0,05
całkowity pH 6,5	3,03 ± 0,09	0,21 ± 0,08
przez układ N pH 7,4	1,3 ± 0,13	0,87 ± 0,06
przez układ N pH 6,5	1,25 ± 0,09	0,81 ± 0,07

Wyniki przedstawiono jako średnią z 3 niezależnych doświadczeń ± SD.

V. 6. Pomiar wewnątrzkomórkowego pH (pHi) po farmakologicznym zahamowaniu wymiennika Na^+/H^+ w pożywce standardowej i w medium o obniżonym pH w linii glejaka T98G i hodowli pierwotnej astrocytów

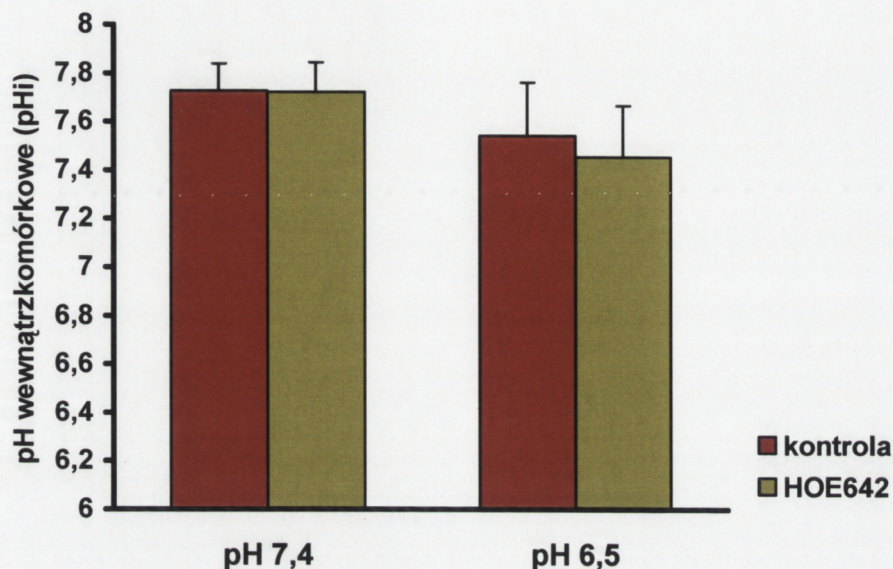
Pomiarowi wewnątrzkomórkowego pH (pHi) po farmakologicznym zahamowaniu wymiennika Na^+/H^+ inhibitorem HOE642 ($10\mu\text{M}$) w pożywce standardowej i w obniżonym pH poddano hodowlę pierwotną astrocytów i linię glejaka T98G. Zbadano łączny wpływ zahamowania wymiennika Na^+/H^+ i inkubacji w medium o obniżonym pH na wewnątrzkomórkowe pH. W przypadku hodowli pierwotnej astrocytów zaobserwowano tendencję wzrostu pHi po 4-godzinnym zahamowaniu Na^+/H^+ w pożywce o pH standardowym oraz brak zmian pHi w obecności HOE642 w pożywce o pH 6,5 (**Ryc.V.30**). Linia glejaka T98G nie wykazywała zmian pHi po zablokowaniu wymiennika Na^+/H^+ ani w pożywce kontrolnej, ani w pożywce o obniżonym pH (**Ryc.V.31**).

Ryc.V.30. Wpływ farmakologicznego zahamowania wymiennika Na^+/H^+ z użyciem inhibitora HOE642 na pH wewnątrzkomórkowe w hodowli pierwotnej astrocytów



Wyniki przedstawiono jako średnią z 4 niezależnych doświadczeń \pm SD.

Ryc.V.31. Wpływ farmakologicznego zahamowania wymiennika Na^+/H^+ z użyciem inhibitora HOE642 i 4h inkubacji w medium o obniżonym pH na pH wewnątrzkomórkowe w linii glejaka T98G



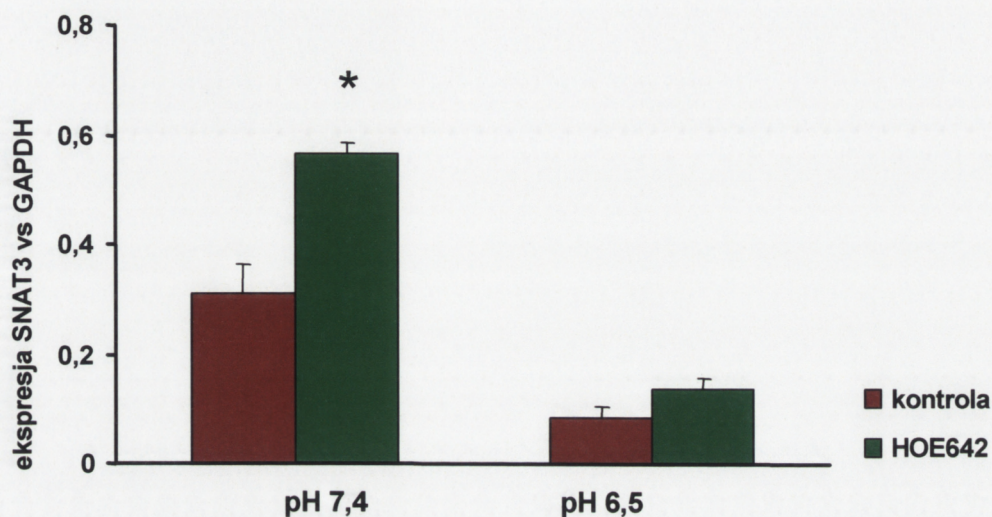
Wyniki przedstawiono jako średnią z 8-9 niezależnych doświadczeń \pm SD.

V. 7. Analiza ekspresji mRNA kodującego SNAT3 po farmakologicznym zahamowaniu wymiennika Na^+/H^+ w pożywce standardowej i w medium o obniżonym pH w linii glejaka C6 i glejaka T98G

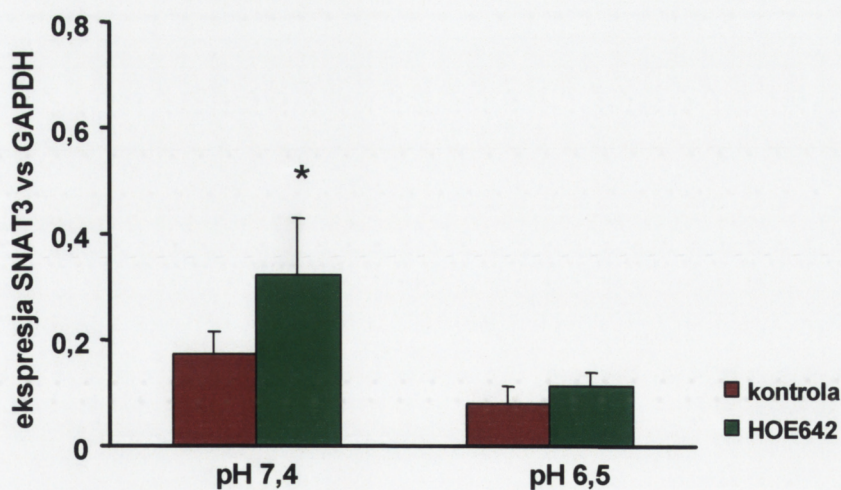
Analizie ekspresji mRNA genu kodującego białko transporterowe SNAT3 w medium o obniżonym pH i w obecności inhibitora wymiennika Na^+/H^+ - HOE642 (10 μM) poddano linie glejaka C6 oraz T98G. Ekspresja mRNA genu kodującego SNAT3 wzrosła ponad 2-krotnie po 4h inkubacji z HOE642 w pożywce standardowej, zarówno w linii C6, jak i T98G. W pożywce o obniżonym pH wzrost ten był nieznamiennej statystycznie w obu badanych liniach komórkowych (Ryc.V.32 A, B).

Ryc.V.32. Wpływ inhibitora wymiennika Na^+/H^+ na ekspresję mRNA kodującego białko transporterowe SNAT3, mierzoną stosunkiem intensywności produktu reakcji RT-PCR badanego białka do genu białka GAPDH, po 4h inkubacji w medium o obniżonym pH oraz w pożywce standardowej w linii glejaka C6 (A) i linii glejaka T98G (B)

A



B



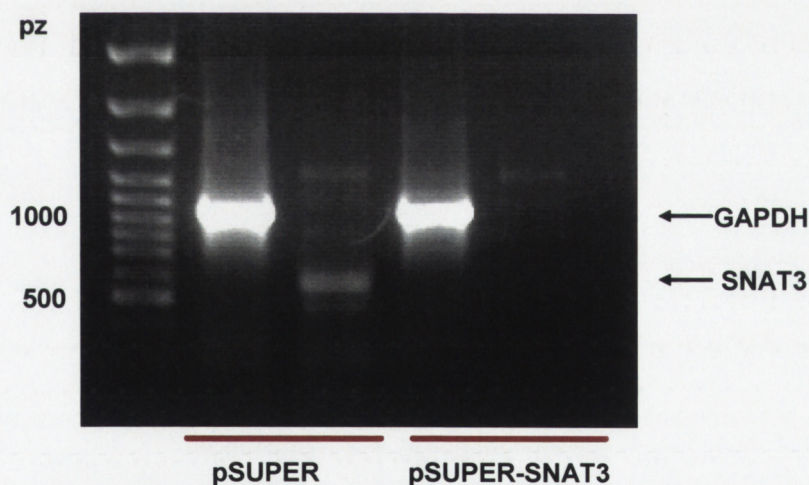
Wyniki przedstawiono jako średnią z 3 niezależnych doświadczeń \pm SD. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli (inkubacji w pożywce o pH standardowym) (Mann-Whitney test).

V. 8. Własności komórek linii glejaka T98G po transfekcji plazmidem z wklonowaną sekwencją skierowaną przeciwko SNAT3

V. 8.1. Ekspresja mRNA kodującego SNAT3

Po wklonowaniu sekwencji siRNA skierowanej przeciwko mRNA kodującemu ludzki SNAT3 do plazmidu pSUPER wykonano transfekcję linii glejaka T98G pustym plazmidem pSUPER i plazmidem ze wstawką siRNA - pSUPER-SNAT3. Po 42h od transfekcji wykonano analizę ekspresji mRNA genu kodującego SNAT3 z użyciem metody RT-PCR. Wykazano spadek ekspresji mRNA tego genu po transfekcji plazmidem pSUPER-SNAT3 w porównaniu z transfekcją plazmidem kontrolnym pSUPER (**Ryc.V.33**).

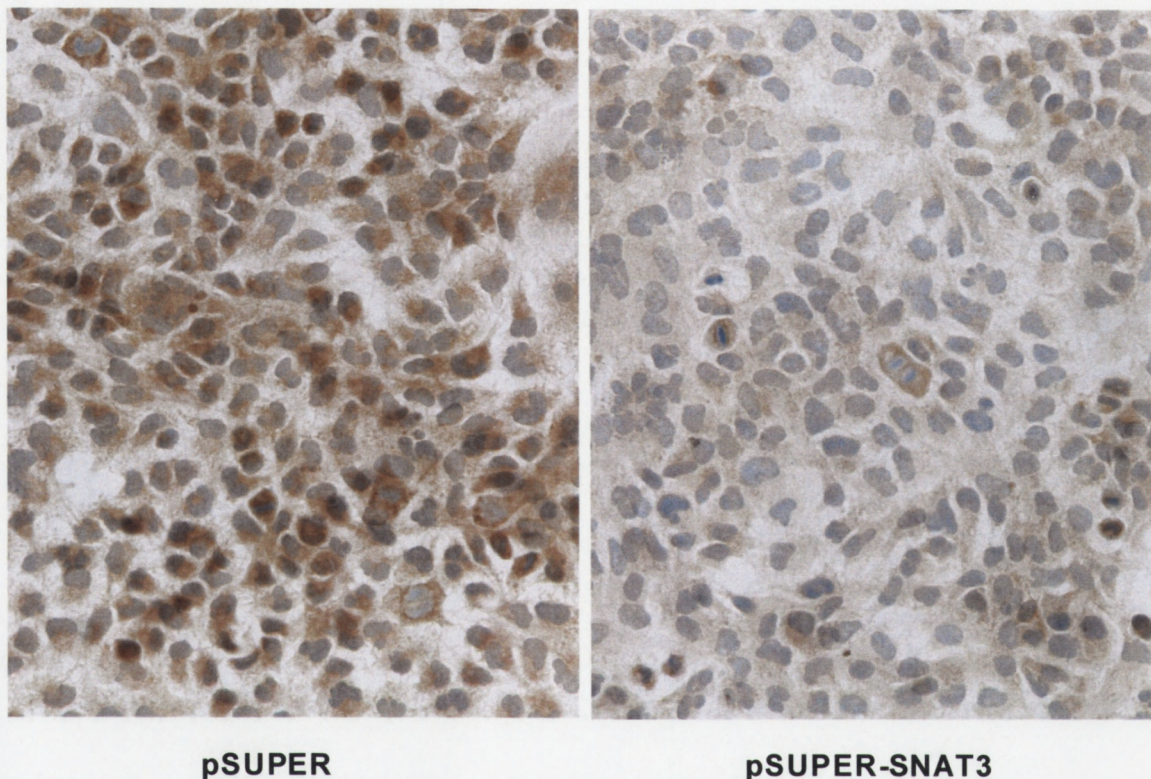
Ryc.V.33. Ekspresja mRNA genu kodującego białko transporterowe SNAT3 i genu kodującego białko GAPDH po 42h transfekcji linii glejaka ludzkiego T98G plazmidami pSUPER (kontrola) i pSUPER-SNAT3



V. 8.2. Barwienie immunocytochemiczne na obecność transportera SNAT3

Linia glejaka T98G po 42h od transfekcji plazmidami: pSUPER (kontrola) i pSUPER-SNAT3 poddana została barwieniu immunocytochemicznemu z użyciem przeciwciała anty-SNAT3. Zaobserwowano silną immunoekspresję SNAT3 w przypadku transfekcji plazmidem pSUPER i słabą w przypadku plazmidu z wklonowaną sekwencją siRNA anty-SNAT3 (**Ryc.V.34**).

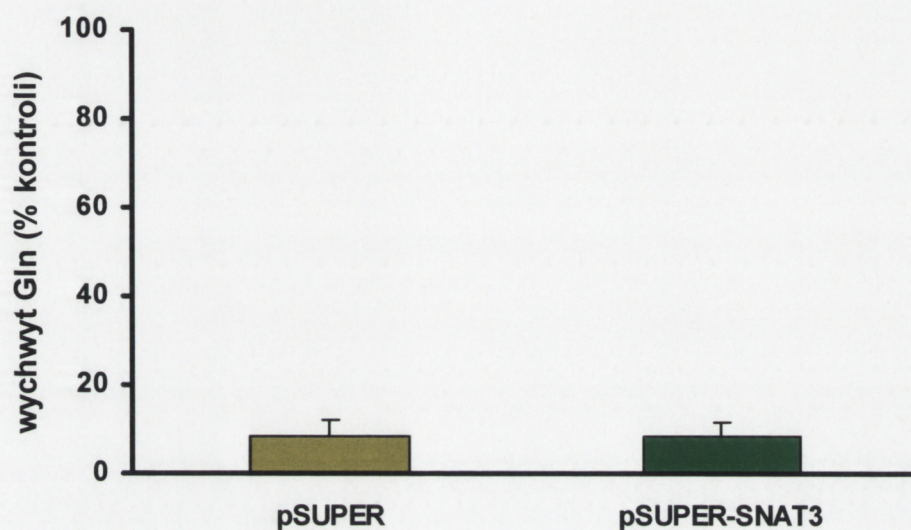
Ryc.V.34. Immunoekspresja SNAT3 w komórkach T98G transfekowanych plazmidem kontrolnym (pSUPER) oraz zawierającym wklonowaną sekwencję siRNA (pSUPER-SNAT3), x 1000



V. 8.3. Wychwył Gln przez komórki

Po 42 godzinach od transfekcji komórek linii glejaka T98G wykonano pomiar całkowitego wychwył Gln oraz udziału układu N w tym procesie. Nie stwierdzono różnic w wychwył całkowitym glutaminy w przypadku transfekcji plazmidem pSUPER-SNAT3 w porównaniu z kontrolą (transfekcja pSUPER). Udział układu N był taki sam dla komórek transfekowanych plazmidem pSUPER oraz pSUPER-SNAT3 i w obu przypadkach wynosił on około 8,5% wychwył całkowitego (**Ryc.V.35**).

Ryc.V.35. Transport Gln przez układ N do komórek glejaka T98G po 42h transfekcji plazmidami: pSUPER i pSUPER-SNAT3, mierzony w obecności inhibitorów pozostałych układów: MeAIB (A), Thr (ASC), Leu (L)

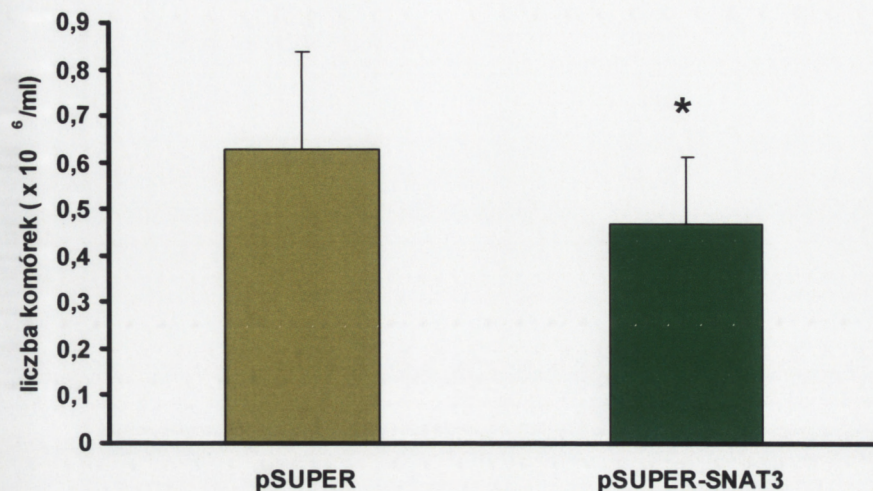


Wyniki przedstawiono jako średnią z 3 niezależnych doświadczeń \pm SD.

V. 8.4. Liczba komórek

Porównano liczbę komórek linii glejaka T98G po 42h od transfekcji plazmidem pSUPER (kontrola) oraz pSUPER-SNAT3 w hodowlach, w których wyjściowo liczba komórek była jednakowa. Zaobserwowano 28-procentowy, znamieny statystycznie spadek liczby komórek po transfekcji plazmidem pSUPER-SNAT3 w stosunku do komórek transfekowanych plazmidem pSUPER (kontrola) (Ryc. V.36).

Ryc.V.36. Liczba komórek po 42h od transfekcji linii glejaka T98G plazmidami: pSUPER (kontrola) i pSUPER-SNAT3



Wyniki przedstawiono jako średnią z 4 niezależnych doświadczeń \pm SD. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli (Mann-Whitney test).

V. 8.5. Indeks proliferacji

Po 42h od transfekcji plazmidem pSUPER (kontrola) oraz pSUPER-SNAT3 linii glejaka T98G komórki poddano barwieniu immunocytochemicznemu na obecność antygenu Ki-67. Indeks proliferacji wyznaczano poprzez liczenie komórek pozytywnie reagujących z przeciwciałem anti-Ki-67 na 1000 komórek, a wyniki przedstawiono w procentach. Immunoekspresja po transfekcji plazmidem kontrolnym oraz plazmidem z wklonowaną sekwencją siRNA była prawie identyczna (Tabela V.3).

Tabela V.3. Indeks proliferacji po transfekcji plazmidem pSUPER (kontrola) oraz pSUPER-SNAT3 linii glejaka T98G

Immunoekspresja Ki-67 (%)	pSUPER	pSUPER-SNAT3
obecność	85 \pm 8	86 \pm 7
brak	15 \pm 1	14 \pm 2

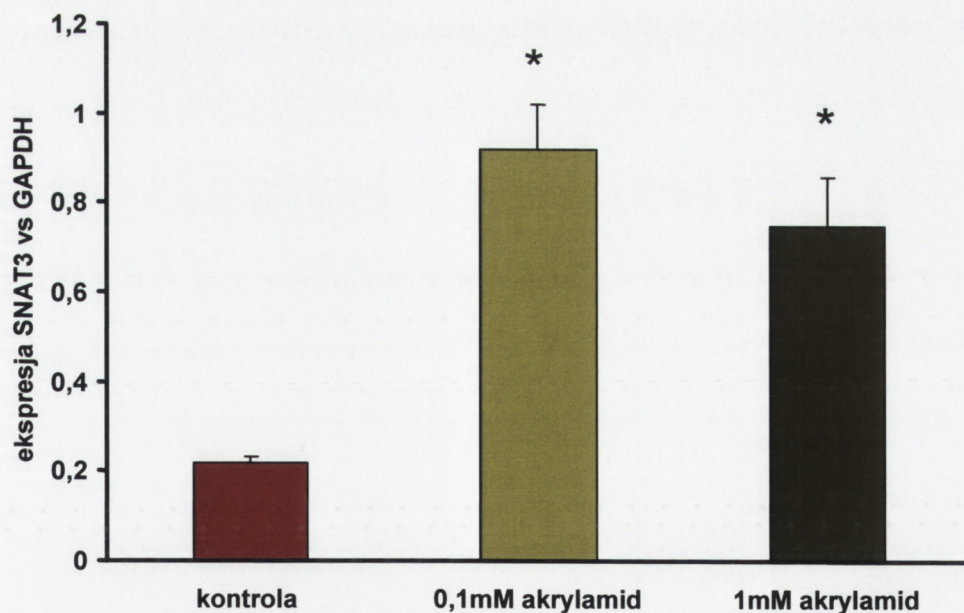
Wyniki przedstawiono jako średnią z 3 niezależnych doświadczeń \pm SD.

V. 9. Ekspresja mRNA genu kodującego białko transporterowe SNAT3 w warunkach inkubacji z karcynogenem (akrylamid) w hodowli pierwotnej astrocytów

Ekspresja mRNA genu kodującego SNAT3 ulegała ponad 4-krotnemu podwyższeniu po 6h inkubacji w medium zawierającym 0,1 mM akrylamid w hodowli pierwotnej astrocytów w stosunku do hodowli w medium standardowym. W przypadku wyższego stężenia akrylamidu (1 mM) stwierdzono około 3-krotny wzrost ekspresji mRNA (**Ryc.V.37**).

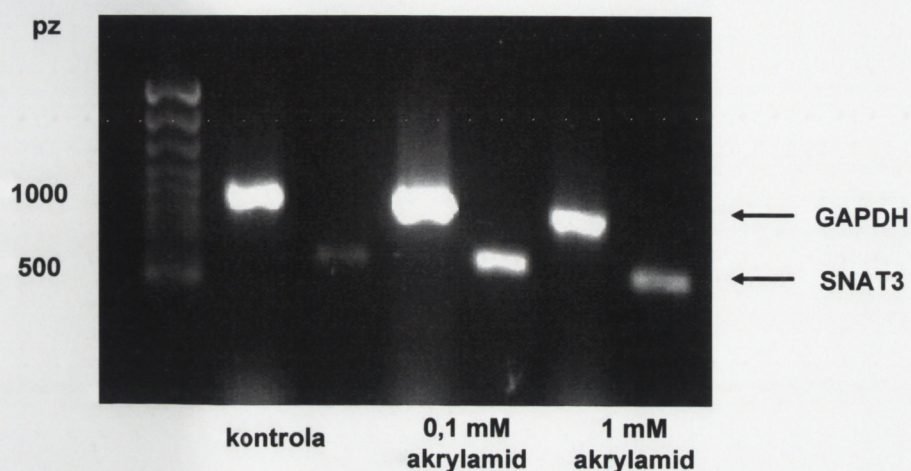
Elektroforetyczny rozdział na żelu agarozowym produktu RT-PCR mRNA kodujących SNAT3 (578 pz) i białko konstytutywne GAPDH (998 pz) w warunkach kontrolnych i w obecności akrylamidu w hodowli pierwotnej astrocytów przedstawia **Ryc. V.38**.

Ryc. V.37. Wpływ akrylamidu na ekspresję mRNA kodującego SNAT3, mierzona stosunkiem intensywności produktu reakcji RT-PCR badanego białka do ekspresji genu białka GAPDH, w hodowli pierwotnej astrocytów



Wyniki przedstawiono jako średnią z 3 niezależnych doświadczeń \pm SD. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli (Mann-Whitney test).

Ryc.V.38. Analiza ekspresji mRNA genu kodującego białko transporterowe SNAT3 oraz białko GAPDH w hodowli pierwotnej astrocytów po 24h inkubacji z 0,1 mM i 1 mM akrylamidem

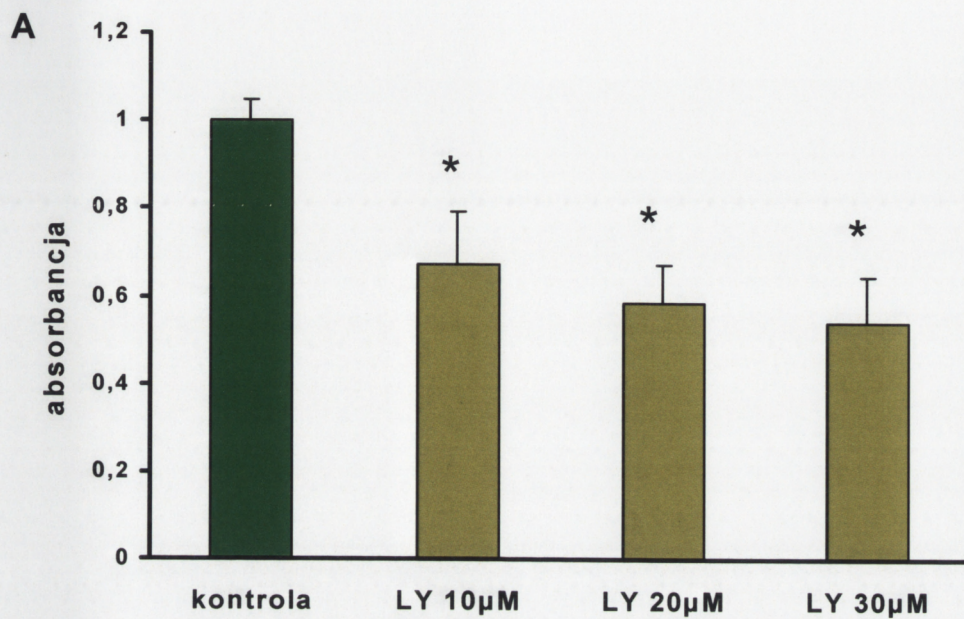


V. 10. Wpływ zahamowania aktywności PI3K na żywotność komórek linii glejaka T98G

Test MTT wykazał spadek przeżywalności komórek linii glejaka T98G po 24h inkubacji w medium hodowlanym z inhibitorem PI3K - LY294002. Spadek ten był zależny od dawki inhibitora (**Ryc.V.39A**).

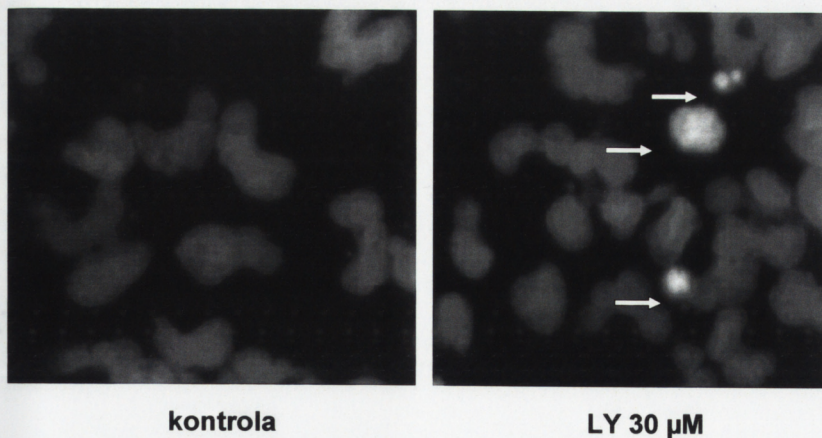
Morfologiczne zmiany chromatyny jądrowej wizualizowano poprzez barwienie odczynnikiem Hoechst 33258. Po 24h inkubacji z inhibitorem LY294002 (30 μ M) obserwowano fragmentaryzację bądź kondensację chromatyny, świadcząca o zachodzącej w tych warunkach w badanej linii komórek apoptozie (**Ryc.V.39B**).

Ryc.V.39. Żywotność (test MTT) (A) i zmiany morfologii jądrowej (B) komórek linii glejaka T98G po zahamowaniu aktywności PI3K poprzez 24h inkubację z inhibitorem LY294002



Wyniki przedstawiono jako średnią z 4 niezależnych doświadczeń \pm SD. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli (Mann-Whitney test).

B

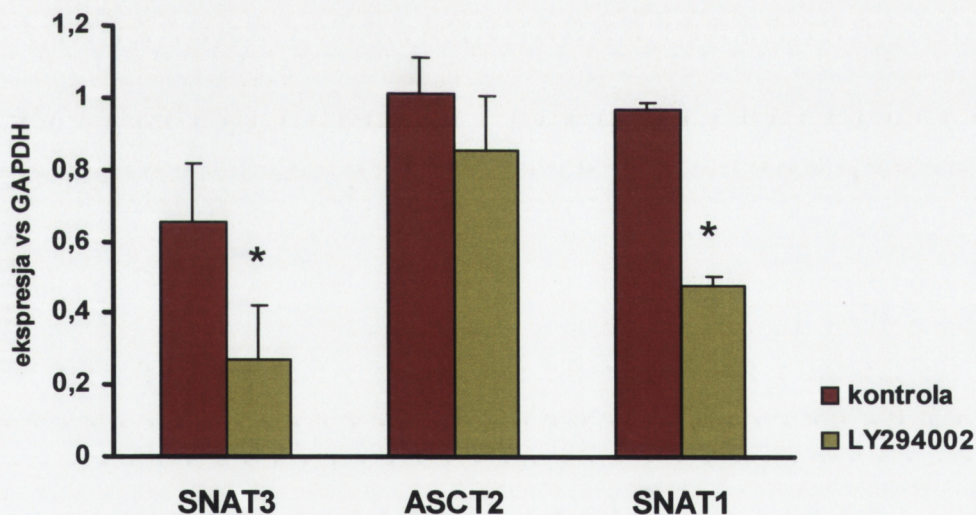


Komórki barwiono Hoechst 33258. Strzałki wskazują jądra apoptotyczne.

V. 11. Ekspresja mRNA genów kodujących białka transportujące Gln: SNAT3, ASCT2 oraz SNAT1 po inkubacji z inhibitorem PI3K w linii glejaka T98G

Ekspresja mRNA genu kodującego SNAT3 oraz SNAT1 ulegała ponad 2-krotnemu obniżeniu po 4h inkubacji w medium zawierającym inhibitor PI3K – LY294002 (30 μ M) w stosunku do kontroli. Ekspresja mRNA kodującego ASCT2 ulegała statystycznie nieznamiennemu spadkowi (Ryc.V.40).

Ryc.V.40. Ekspresja mRNA genów kodujących SNAT3, ASCT2 i SNAT1, mierzona stosunkiem intensywności produktu reakcji RT-PCR badanego białka do genu białka GAPDH, po 4h inkubacji w medium zawierającym inhibitor PI3K LY294002 (30 μ M) oraz medium standardowym (kontrola) komórek glejaka T98G



Wyniki przedstawiono jako średnią z 4-6 niezależnych doświadczeń \pm SD. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli (Mann-Whitney test).

VI. DYSKUSJA

Jak podkreślono we wstępie rola glutaminy jako substratu energetycznego a także źródła azotu niezbędnego w syntezie nukleotydów i białek została udokumentowana w badaniach na wielu typach nowotworów oraz linii komórkowych. Miejsce Gln w guzach OUN jest szczególne z uwagi na jej udział w biosyntezie kwasu glutaminowego – czynnika silnie sprzyjającego inwazyjności glejaków. Innym zjawiskiem promującym przeżywalność nowotworów OUN a związanym pośrednio z metabolizmem glutaminy jest wzmożona synteza glutationu – czynnika, który warunkuje oporność na radio- i chemioterapię.

Liczne dane literaturowe wskazują, że komórki nowotworowe na zwiększone zapotrzebowanie na Gln reagują wzmożeniem jej transportu poprzez wzrost aktywności białek transportujących ten aminokwas. Z drugiej strony zjawisko to w liniach wyprowadzonych z guzów OUN jest wciąż aktualnym zagadnieniem, a w glejakach ludzkich o najwyższym stopniu złośliwości i wyprowadzonych z nich hodowlach pierwotnych zbadanym po raz pierwszy w naszym laboratorium.

VI. 1. Ekspresja mRNA genów kodujących białka transportujące Gln w glejakach o najwyższym stopniu złośliwości, przerzutach do układu nerwowego nowotworów narządów obwodowych oraz w hodowlach pierwotnych wyprowadzonych z glejaków

Wzmożony transport Gln w nowotworach wiąże się z nadreprezentacją i tym samym nadczynnością transportera ASCT2. Prawidłowość ta, jak zaznaczono we wstępie, została udokumentowana na wielu liniach nowotworowych. Nadreprezentacja transportera ASCT2 wydaje się mieć szczególne znaczenie w procesie nowotworzenia, gdyż jego ekspresja koreluje ze śmiertelnością chorych na raka okrężnicy oraz gruczołu krokowego [Witte i wsp., 2002; Li i wsp., 2003] i może okazać się kluczowym markerem w diagnostyce tych schorzeń. Jak sugerują Fuchs i Bode [2005] mechanizm udziału transportera ASCT2 w nowotworzeniu

opiera się na aktywacji kinazy mTOR zaangażowanej m.in. w proliferację komórek nowotworowych [Kristof i wsp., 2005, Meng i wsp., 2006]. Jak zaznaczono we wstępie w szlaku tym uczestniczy również transporter układu L - LAT1. Niemniej jednak transporter ten nie był przedmiotem badań niniejszej rozprawy, z uwagi na niską swoistość substratową w stosunku do Gln - wariant ten preferencyjnie rozpoznaje leucynę [Oxender i Christensen, 1963].

Pierwsza praca dotycząca analizy ekspresji transporterów należących do układów swoistych dla Gln w guzach OUN o najwyższym stopniu złośliwości *in situ* pochodzi z naszego laboratorium [Sidoryk i wsp., 2004]. Zaobserwowana nadekspresja mRNA kodującego ASCT2 w glejakach i w przerzutach nowotworów obwodowych do OUN, potwierdziła znane w literaturze i opisane we wstępie zjawisko nadreprezentacji tego transportera w wielu nowotworach (**Ryc.V.7, 9**). Jak wynika z naszych obserwacji ta wysoka ekspresja utrzymuje się również w hodowlach pierwotnych wyprowadzonych z guzów OUN (**Ryc.V.11**).

Interesujące wyniki uzyskano z analizy ekspresji transporterów należących do najbardziej swoistego dla Gln układu N. W tym przypadku zaobserwowano nadekspresję transportera SNAT3, przy braku zmian w ekspresji SNAT5 w materiale biopsyjnym glejaków złośliwych (**Ryc.V.7**). Warto zaznaczyć, że cechą różniącą oba transportery u człowieka jest powszechność występowania SNAT5 niemal we wszystkich tkankach i stosunkowo wąska swoistość tkankowa SNAT3; poza OUN transporter ten wykryto w nerce i wątrobie [Nakanishi i wsp., 2001 a]. Nadreprezentacja SNAT3 okazała się być zjawiskiem swoiście występującym w złośliwych glejakach *in situ*, gdyż nie stwierdzono jej ani w przerzutach pochodzących z nowotworów obwodowych, ani w guzie pochodzenia glejowego o niższym stopniu złośliwości wg WHO (**Ryc.V.8, 9**). Ponadto obserwowano wybiórczy zanik lub obniżenie ekspresji mRNA kodującego SNAT3 w hodowlach komórkowych wywodzących się z glejaków. Zjawisko to w mniejszym stopniu dotyczyło również transportera SNAT5 (**Ryc.V.11**).

W przypadku przedstawiciela układu A - SNAT1 nie zaobserwowano zmian ekspresji ani w glejakach OUN, ani w hodowlach komórkowych z nich wyprowadzonych (**Ryc.V.7, 11**). Wynik ten wydaje się pozornie sprzeczny z bogatą literaturą dokumentującą wrażliwość układu A na czynniki środowiskowe [Moule i McGivan, 1987; McGivan i Pastor-Anglada, 1994]. Warto zaznaczyć, że czynnikiem wpływającym na ekspresję mRNA kodującego SNAT1 są substraty dla

układu A [Gazzola i wsp., 2001; Ling i wsp., 2001]. W przypadku przedstawionych obserwacji na liniach komórkowych stosowano medium kompletne. Z drugiej strony brak jest danych, czy w tkankach guzów dochodzi do zmian w zawartości substratów.

VI. 2. Rola SNAT3 w metabolizmie komórek glejaka

Nadrepreszacja mRNA kodującego transporter SNAT3 w złośliwych glejakiach zrodziła pytanie czy ma ona związek z procesem nowotworzenia. Hipotezę tę wzmocniły obserwacje, iż karcynogen - akrylamid wywołuje wzrost ekspresji mRNA dla SNAT3 w hodowli pierwotnej astrocytów (**Ryc.V.37**), a także stymuluje transport Gln przez układ N [Wu i wsp., 2005].

Poniżej, na podstawie danych literaturowych i badań własnych rozpatrzono potencjalny udział SNAT3 w procesie regulacji pH komórek glejaka *in vitro* oraz rolę tego transportera w dostarczaniu Gln do tych komórek.

VI. 2.1. Ekspresja SNAT3 po obniżeniu pH środowiska oraz po zahamowaniu wymiennika Na^+/H^+ : czy transporter ten pełni rolę w regulacji pH?

SNAT3 ma zdolność dwukierunkowego transportu Gln na zewnątrz, albo do wewnątrz komórki w zależności od stężenia tego aminokwasu oraz jonów H^+ [Chaudhry i wsp., 2001]. Jak zaznaczono we wstępie w oocytach *Xenopus laevis* transfekowanych SNAT3 oraz w hodowli pierwotnej astrocytów pobieranie Gln skutkuje wzrostem pH wewnątrzkomórkowego. W przypadku kwasicy nerkowej zaobserwowano nadekspresję mRNA kodującego SNAT3, wzrost poziomu białka, a jednocześnie zintensyfikowany sodozależny transport Gln. Ostatnie doniesienia sugerują, że SNAT3 pełni funkcje regulatora pH nerce [Karinch i wsp., 2002; Solbu i wsp., 2005].

Cechy czynnościowe transportera SNAT3 i najnowsze doniesienia na temat jego potencjalnej roli w regulacji pH w kwasicy nerkowej skłoniły do sformułowania hipotezy, że pełni on podobne funkcje w glejakiach. Do zbadania tego zagadnienia dodatkowo przyczyniła się wiedza na temat regulacji pH w transformowanym nowotworowo gleju, gdzie przebiega ona inaczej niż w prawidłowych astrocytach [Hubesch i wsp., 1990]. Glejaki w przeciwieństwie do

tkanki prawidłowej cechuje znaczna różnica pomiędzy pH wewnątrz - i zewnątrzkomórkowym [McLean i wsp., 2000]. W guzach OUN, pomimo zwiększonej produkcji jonów H^+ , obserwuje się wyższe pH_i niż pH_e [Hubesch i wsp., 1990]. Utrzymywanie wysokiego pH_i i niskiego pH_e sprzyja inwazyjności gleju transformowanego. Jakkolwiek głównym regulatorem pH w glejakach jest wymiennik Na^+/H^+ [McLean i wsp., 2000], SNAT3 mógłby dodatkowo uczestniczyć w regulacji pH, z uwagi na wysoki wymóg komórek nowotworowych wobec zachowania odpowiedniego pH.

Z przedstawionych w pracy obserwacji jasno wynika, iż 4-godzinne obniżenie pH medium hodowlanego do 6,5 skutkuje wybiórczym spadkiem ekspresji mRNA kodującego SNAT3. Prawidłowość tę zaobserwowano zarówno na liniach wywodzących się z glejaków: szczurzego i ludzkiego, jak i w hodowli pierwotnej astrocytów (**Ryc.V.18-23**).

Z drugiej strony zaobserwowano wzrost ekspresji mRNA dla SNAT3 w warunkach farmakologicznego zahamowania głównego w komórkach glejaków regulatora pH - wymiennika Na^+/H^+ w liniach glejaka: szczurzego i ludzkiego (**Ryc.V.32A, B**).

Zahamowanie wymiennika Na^+/H^+ nie wpłynęło na zmianę pH_i w komórkach linii glejaka T98G inkubowanych zarówno w medium o obniżonym jak i standardowym pH (**Ryc.V.31**). Z kolei w hodowli pierwotnej astrocytów inhibitor HOE642 powodował wzrost wewnątrzkomórkowego pH, ale tylko w pożywce o niezmiennym pH (**Ryc.V.30**). Taka obserwacja pośrednio wskazuje na szybką odpowiedź transformowanego nowotworowo gleju na zahamowanie kluczowego regulatora pH poprzez aktywację innych mechanizmów regulacyjnych. Obserwowany wzrost ekspresji mRNA kodującego SNAT3 w warunkach zahamowania wymiennika Na^+/H^+ sugeruje zastępczy udział tego transportera w regulacji pH. Można sądzić, iż taki dodatkowy mechanizm astrocyty prawidłowe uruchamiają dopiero po zadziałaniu silniejszym bodźcem, takim jak jednoczesne podanie inhibitora HOE642 i zmiana pH medium hodowlanego.

Próbie odpowiedzi na pytanie, czy SNAT3 pełni rolę regulatora pH w glejakach podjęto blokując jego ekspresję przy użyciu metody siRNA. Spodziewano się, że po wyciszeniu genu nastąpi zmiana w regulacji pH w badanych liniach glejaka. Powstałe problemy metodyczne uniemożliwiły odpowiedź na to pytanie. Komórki transfekowane, zarówno kontrolnym plazmidem pSUPER, jak i

zawierającym sekwencję anty-SNAT3 cechowała wyjątkowa wrażliwość na warunki doświadczenia. Wydaje się, że zwiększenie przepuszczalności błon komórkowych pod wpływem odczynnika użytego do transfekcji komórek, a następnie dodatkowa destabilizacja błon przez digitoninę używaną przy pomiarze pHi, osłabiają procesy życiowe komórki i uniemożliwiają prawidłowy odczyt. Próby pokonania tych barier metodycznych zostaną podjęte w dalszych badaniach nieobjętych w niniejszej rozprawie.

VI. 2.2. Transport Gln w warunkach obojętnego i obniżonego pH oraz po wyciszeniu ekspresji transportera SNAT3 metodą siRNA

Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie wykazały dominację układu ASC w transporcie Gln, we wszystkich badanych typach komórek. W przypadku linii glejaka C6 transport Gln za pośrednictwem układu ASC stanowił około 60% wychwyty całkowitego (**Ryc.V.27**), co jest potwierdzeniem wcześniejszych doniesień dotyczących charakterystyki funkcjonalnej transportu w tej linii glejaka [Dolińska i wsp., 1999; Dolińska i wsp., 2003]. W linii glejaka T98G oraz w hodowli pierwotnej astrocytów udział tego układu w całkowitym transporcie Gln był nieco niższy i wynosił około 40% (**Ryc.V.28-29**). Obserwacje te są zgodne z obserwowaną wysoką ekspresją transportera ASCT2 w badanych liniach glejaków oraz w glejakach *in situ* (**Ryc.V.7, 11**).

Zaobserwowany brak zmian w transporcie Gln za pośrednictwem układu ASC po obniżeniu pH medium hodowlanego (**Ryc.V.27-29**) jest zgodny z brakiem znaczących zmian w ekspresji mRNA kodującego transporter ASCT2 w tych warunkach doświadczalnych we wszystkich badanych typach komórek (**Ryc.V.18, 20, 22**).

Charakterystyka funkcjonalna poszczególnych układów w transporcie Gln wykazała znikomy udział układu N w tym procesie. Komórki linii glejaka ludzkiego i szczurzego transportowały Gln za pośrednictwem układu N w około 7%, a komórki hodowli pierwotnej astrocytów w 18% wychwyty całkowitego (**Ryc.V.27-29**).

Postanowiono zbadać wychwyty Gln za pośrednictwem układu N w warunkach obniżonej ekspresji mRNA kodującego SNAT3, a zatem po 4-godzinnym zakwaszeniu pożywki oraz po wyciszeniu mRNA metodą siRNA. W

obu typach doświadczeń nie stwierdzono istotnych zmian w całkowitym wychwycie Gln oraz w udziale układu N w tym procesie (**Ryc.V.27-29, 35**). Ponadto analiza kinetyczna wychwyty całkowitego oraz wychwyty przez układ N nie wykazała zmian ani w V_{max} ani w K_m po zakwaszeniu medium hodowlanego (**Tabela V.1-2**). Taki efekt można tłumaczyć znikomym zaangażowaniem układu N w transport Gln.

Niewykluczone, że w wychwycie Gln za pośrednictwem układu N dominującą rolę odgrywa transporter SNAT5. Hipotezę tę zdaje się potwierdzać stały poziom ekspresji tego transportera w komórkach linii glejaka T98G hodowanych w medium o standardowym i obniżonym pH (**Ryc.V.20**).

VI. 3. Mechanizm odpowiedzialny za spadek ekspresji mRNA dla SNAT3

Xiang i wsp. [2003] zaobserwowali spadek ekspresji mRNA kodującego SNAT3 w hodowli wyprowadzonej ze splotu naczyńówki szczura. W niniejszej pracy również wykazano wrażliwość ekspresji mRNA dla SNAT3 na zmiany środowiska, takie jak hodowanie glejaków poza ustrojem oraz obniżenie pH medium hodowlanego.

Taka obserwacja zrodziła pytanie, jaki jest mechanizm zmian poziomu transkrypcji - czy ma on związek ze spadkiem syntezy czy stabilności mRNA. Zasadność badań w tym kierunku wzmocniły dane literaturowe dotyczące znaczenia sekwencji bogatej w adeninę i uracyl - AURE w 3'UTR mRNA genu kodującego SNAT3 w nerce w warunkach kwasicy nerkowej [Solbu i wsp., 2005]. Sekwencja ta bierze udział w regulacji ekspresji genów – jej obecność powoduje, że transkrypt ma krótki okres półtrwania, natomiast na skutek działania czynników stresowych, czas ten znacząco się wydłuża. Ponadto AURE występuje w 3'UTR mRNA genów wczesnej odpowiedzi (ang. *ERGs - early response genes*), takich jak cytokiny, limfokiny i protoonkogeny [Shaw i Kamen, 1988]. Stwierdzono, że sekwencja ta może zarówno kontrolować stabilność mRNA protoonkogenu *c-Myc*, jak i wpływać na jego lokalizację w przedziałach komórkowych [Veyrone i wsp., 1996]. Wiadomo również, że funkcje regulacyjne tej sekwencji opierają się na interakcji z białkami wiążącymi RNA [Fan i Steitz, 1998].

W przypadku SNAT3 w badaniach przeprowadzonych przez Solbu i wsp. [2005] oraz w badaniach przedstawionych w niniejszej pracy czynnikiem stresowym była zmiana pH. Sekwencję w obszarze 3'UTR określa się w tym

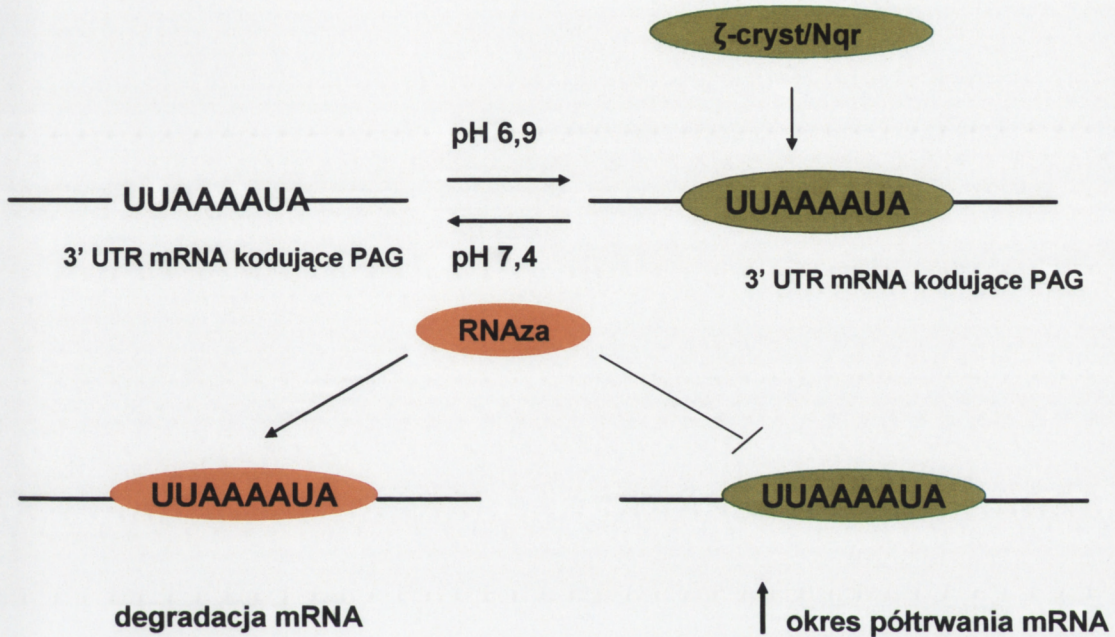
przypadku jako element odpowiedzi na pH – pH-RE (ang. *pH- response element*) [Solbu i wsp., 2005]. Aby odpowiedzieć na pytanie czy obserwowany spadek poziomu ekspresji mRNA wiąże się ze zmianami jego stabilności, transkrypcję w komórkach hamowano przy użyciu inhibitora polimerazy II - 5-6-dichloro-1- β rybofuranozylobenzoimidazolu (DRB). Spadek poziomu mRNA pod wpływem obniżonego pH medium hodowlanego w obecności, jak i pod nieobecność DRB był podobny (**Ryc.V.25-26**). Wynik ten sugeruje, że obniżenie mRNA w warunkach niskiego pH wiąże się głównie, jeśli nie wyłącznie ze spadkiem jego stabilności. Niewykluczone, że w takich warunkach ma miejsce aktywacja RNAz, a w konsekwencji degradacja mRNA.

Uzyskany wynik różni się od wyników badań ekspresji mRNA kodującego SNAT3 w kwasicy nerkowej. Jak wspomniano we wstępie obniżenie pH skutkuje zarówno wzrostem mRNA, jak i białka SNAT3 w nerce, co, jak postulują autorzy doniesienia, ma związek z sekwencją AURE w regionie 3'UTR genu. W przypadku genu kodującego PAG – kluczowy enzym metabolizmu Gln, dobrze udokumentowano mechanizm wzrostu stabilności mRNA w warunkach obniżonego pH [Curthoys i Gstraunthaler, 2001]. Opiera się on na wzroście powinowactwa białka ζ -cryst/Nqr (ζ -krystalina/reduktaza NADPH:chinon) do sekwencji pH-RE genu i skutkuje podwyższonym okresem półtrwania mRNA w niskim pH. W tych warunkach obserwuje się jednocześnie spadek aktywności RNAz. Z kolei w pH obojętnym powinowactwo reduktazy do AURE jest niskie, co prowadzi do degradacji mRNA [Curthoys i wsp., 2001] (**Ryc.VI.1**).

Brak wzrostu stabilności mRNA dla SNAT3 w linii glejaka C6 można również tłumaczyć szybką regulacją pH komórek w warunkach obniżenia pH medium hodowlanego (**Ryc.V.31**). Z drugiej strony, przedstawiony w niniejszej pracy spadek stabilności mRNA genu kodującego SNAT3 w linii glejaka C6 nie wyklucza wzrostu okresu półtrwania mRNA tego genu w glejakach *in situ*. Nadreprezentacja mRNA dla SNAT3 w guzach glejopochodnych OUN mogłaby wskazywać na taki właśnie mechanizm. Obserwowany spadek ekspresji tego genu w hodowlach glejaka wyprowadzonych z materiału biopsyjnego (**Ryc. V.11**) można tłumaczyć spadkiem stabilności mRNA. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że ekspresja mRNA dla SNAT3 w linii glejaka ludzkiego T98G jest niższa, niż w materiale biopsyjnym (**Ryc.V.7, 20**).

Niewykluczone również, że nadekspresja SNAT3 w glejakach *in situ* wiąże się ze wzrostem stabilności mRNA na skutek interakcji sekwencji AURE w regionie 3'UTR genu z innym czynnikiem niż białko ζ -cryst/Nqr.

Ryc.VI.1. Przypuszczalny mechanizm wzrostu stabilności mRNA genu zawierającego w 3'UTR sekwencję AURE na przykładzie glutaminazy PAG



W niezmiennym pH ζ -cryst/Nqr (ζ -krystalina/reduktaza NADPH:chinonu) wykazuje niskie powinowactwo do bogatej w adeninę i uracyl sekwencji AURE w 3'UTR mRNA kodującego PAG (glutaminaza aktywowana fosforanem). W tych warunkach rośnie powinowactwo RNAz do AURE, co skutkuje degradacją mRNA. W obniżonym pH rośnie powinowactwo ζ -cyst/Nqr do sekwencji AURE, co powoduje wzrost okresu półtrwania mRNA; \rightarrow aktywacja, $\left|$ hamowanie, wg Curthoys i Gstraunthaler [2001].

Znany jest udział białka HuR należącego do rodziny wiążących się z RNA białek Elav (ang. *embryonic lethal, abnormal vision*) w stabilizacji genów prożyciowych [Nabors i wsp., 2001]. Wykazano silne wiązanie się HuR do mRNA genów, których produktami są: naczyniowo - śródbłonkowy czynnik wzrostu VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*); interleukina IL-8; czynnik martwicy nowotworów TNF- α (ang. *tumor necrosis factor α*), czy też czynnik transformujący TGF- β (ang. *transforming growth factor β*). Na potencjalną rolę białka HuR jako stabilizatora mRNA genów, których produkty uczestniczą we wzroście komórki i angiogenezie wskazuje jego wysokie stężenie w komórkach proliferujących OUN.

Ponadto obserwuje się silną nadreprezentację HuR w guzach o najwyższym stopniu złośliwości takich jak *glioblastoma multiforme* czy nowotwór mózgu - *medulloblastoma* [Nabors wsp., 2001].

Niewykluczone zatem, że mRNA kodujący SNAT3 podlega postranskrypcyjnej regulacji poprzez integrację z białkami wiążącymi RNA w glejakiach *in situ*. W konsekwencji dochodzi do wzrostu stabilności i nadekspresji mRNA. Hipoteza ta opiera się na wynikach analizy ekspresji mRNA z pojedynczego przypadku guza astroglejowego o II stopniu złośliwości wg WHO, gdzie obserwowano niższą ekspresję genu kodującego SNAT3 w porównaniu ze złośliwymi glejakami (**Ryc. V.7, 8**).

Wydaje się, że wzrost stabilności mRNA kodującego SNAT3 w złośliwych glejakiach nie utrzymuje się w warunkach *in vitro*, jakkolwiek na tym etapie badań trudno jest wyjaśnić przyczynę tego zjawiska.

VI. 4. Wpływ wyciszenia mRNA genu kodującego SNAT3 na proces namnażania i indeks proliferacji komórek linii glejaka T98G

Zablokowanie mRNA genu kodującego SNAT3 skutkowało spadkiem liczby komórek (**Ryc.V.36**). Na podstawie tej obserwacji można przypuszczać, że transporter ten odgrywa rolę w procesie namnażania komórek glejaka T98G. Taka spekulacja z całą pewnością wymaga dodatkowych potwierżeń. W dalszych planach pozostaje sprawdzenie, czy w wyniku zablokowania genu SNAT3 dochodzi do wzmożonej inicjacji apoptozy.

Wpływ zablokowania mRNA genu kodującego SNAT3 na indeks proliferacji komórek należy interpretować w świetle ich obniżonego namnażania. Brak zmian indeksu proliferacyjnego mierzonego w procentach całej liczby komórek, czyli z uwzględnieniem komórek żywych i martwych (**Tabela V.3**) świadczyć może o względnym wzroście tego indeksu w komórkach żywych, niezabarwionych błękitem trypanu. Można spekulować, że wzrost ten dotyczy jakiejś subpopulacji komórek: albo innej fenotypowo, albo znajdującej się w innym stadium cyklu komórkowego. Udowodnienie jak jest w rzeczywistości wymaga podjęcia odrębnych badań.

VI. 5. Ekspresja mRNA dla SNAT3 a szlak sygnałowy inicjowany przez PI3K w komórkach linii glejaka T98G

Gu i wsp. [2005] badali mechanizm regulacji ekspresji genu transportera SNAT3 przez szlak sygnałowy inicjowany przez PI3K zarówno na poziomie białka, jak i mRNA w linii wyprowadzonej z pierwotnych hepatocytów mysich (H2.35), a także na myszach *in vivo*. Wykazano wzrost poziomu tego białka w warunkach głodzenia zwierząt doświadczalnych, a także w hodowli komórek H2.35 w medium pozbawionym surowicy. Z kolei zwiększone stężenie insuliny wpływało negatywnie na ekspresję mRNA kodującego SNAT3 oraz na poziom białka, a efekt ten był znoszony przez LY294002, inhibitor PI3K oraz rapamycynę - bloker kinazy serynowo-treoninowej mTOR. Ta sama grupa badaczy wykazała w komórkach H2.35 odwrotny do wyżej opisanego mechanizm regulacji przez PI3K ekspresji innego przedstawiciela układu N – transportera SNAT4. W tym przypadku w wyniku zwiększenia stężenia insuliny w medium hodowlanym ma miejsce wzrost ekspresji genu tego transportera na poziomie białka, natomiast LY294002 znosi ten efekt [Gu i wsp., 2003]. Powyższe dane wskazują na przeciwstawną regulację wariantów: SNAT3 i SNAT4 układu N przez szlak sygnałowy inicjowany przez PI3K.

Roli omawianego szlaku w regulacji układu N ani w prawidłowych komórkach OUN, ani w glejakach jak dotąd nie badano. W przypadku guzów ośrodkowego układu nerwowego zbadanie tego zjawiska wydaje się mieć duże znaczenie, z uwagi na udokumentowany wpływ PI3K na ich przeżywalność [porównaj podrozdział II. 3.2. Wstępu].

Z badań przedstawionych w niniejszej rozprawie wynika, że 24h zahamowanie PI3K skutkuje inicjacją procesu apoptozy oraz obniżeniem przeżywalności komórek glejaka T98G (**Ryc.V.39 A, B**). Ponadto zaobserwowano, że już 4h działanie tego inhibitora na komórki powoduje spadek ekspresji mRNA kodującego SNAT3 (**Ryc.V.40**). Można podejrzewać, iż wzmocniony *in vivo* w glejakach szlak sygnałowy PI3K „pozytywnie” reguluje ekspresję SNAT3. Przypuszczenia te wymagają jednak dodatkowych dowodów, dlatego też w dalszych planach jest zbadanie ekspresji mRNA kodującego SNAT3 w warunkach stymulacji PI3K.

Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie wykazały ponadto obniżenie ekspresji mRNA kodującego SNAT1 w warunkach zahamowania PI3K (**Ryc.V.40**). Obserwacje te są zgodne z doniesieniami w literaturze dokumentującymi regulację układu A przez szlak sygnałowy PI3K [Hyde i wsp., 2002].

VI. 6. Przewidywane dalsze kierunki badań

Nieznaczone zahamowanie procesu namazania i niezmienną proliferacją komórek linii glejaka T98G wskutek zablokowania transportera SNAT3 nie wyklucza, że w tych warunkach dochodzi do znaczących zmian w migracji - procesie decydującym o inwazyjności glejaków. Wyjaśnienie tego zagadnienia pozwoli na pełniejsze poznanie roli SNAT3 w procesach związanych z nowotworzeniem.

Ostatnie doniesienie dotyczące funkcjonalnych cech transportu z udziałem SNAT3 dokumentuje jego dotąd nieznaną mechanizm podtrzymujący szansę wykazania udziału SNAT3 w regulacji pH w komórkach transformowanych nowotworowo. Badania prądów protonowych w transfekowanych transporterem oocytach *Xenopus laevis* wykazały, że transport ten w warunkach nieobecności jonów Na^+ nie zależy od substratu, zaś w obecności Gln może odbywać się w sposób niewymagający wymiany jonu Na^+ na H^+ [Schneider i wsp., 2007].

Aby dokładniej poznać rolę SNAT3 w regulacji pH planowane jest zbadanie wpływu zablokowania ekspresji tego transportera przy użyciu siRNA na ekspresję wymiennika Na^+/H^+ . Będzie to stanowić uzupełnienie obserwacji przedstawionej w niniejszej pracy, gdzie zablokowanie aktywności wymiennika skutkowało wzrostem ekspresji mRNA dla SNAT3.

Ponadto planuje się zbadanie funkcji nadekspresji transportera SNAT3 w liniach komórkowych, z użyciem jego konstytywnie aktywnej formy. Być może odtworzenie w hodowli glejaka *in vitro* charakterystycznej dla glejaków *in situ* nadreprezentacji tego transportera pozwoli dokładniej poznać jego rolę w procesie nowotworzenia.

VII. WNIOSKI

1. Glejaki o wysokim stopniu złośliwości: GBM (IV stopień złośliwości wg WHO) i AA (III stopień złośliwości wg WHO) cechuje wyższa niż w prawidłowym mózgu ekspresja mRNA kodujących transportery SNAT3 (układ N) i ASCT2 (układ ASC), a jednocześnie brak różnic w ekspresji mRNA kodujących transportery SNAT5 (układ N) i SNAT1 (układ A).
2. O ile zwiększona ekspresja mRNA kodującego ASCT2 jest cechą wspólną wielu nowotworów, o tyle nadekspresja mRNA kodującego SNAT3 była swoista dla glejaków *in situ* o najwyższym stopniu złośliwości.
3. Spadek ekspresji mRNA kodującego SNAT3 w warunkach hamowania PI3K wskazywał na regulację ekspresji genu tego transportera przez szlak sygnałowy inicjowany przez tę kinazę.
4. Wyróżniającą cechą SNAT3 okazała się wybiórcza zależność ekspresji jego mRNA od czynników środowiskowych. Ekspresja ta znacznie obniżała się w warunkach hodowania glejaków poza ustrojem. Wybiórczy spadek mRNA dla SNAT3 obserwowano w poddanej kilkugodzinnej inkubacji w medium o obniżonym pH linii glejaka szczurzego C6, linii glejaka ludzkiego T98G oraz w hodowli pierwotnej astrocytów. Spadek ten był efektem obniżenia stabilności mRNA, a także, choć w mniejszym stopniu, aktywności transkrypcyjnej. Z kolei karcynogen – akrylamid znacząco wpływał na wzrost ekspresji mRNA kodującego SNAT3 w hodowli pierwotnej astrocytów. Ponadto zanotowano pobudzenie ekspresji SNAT3 w warunkach zahamowania wymiennika Na^+/H^+ . Ta ostatnia obserwacja, w powiązaniu z faktem, że zablokowanie wymiennika Na^+/H^+ nie miało wpływu na pHi ani w linii glejaka T98G, ani w hodowli pierwotnej astrocytów, mogłaby sugerować zdolność SNAT3 do przejmowania funkcji wymiennika w regulacji pH. Hipoteza ta może stanowić interesujący przedmiot dalszych badań.

5. Potwierdzono dominującą rolę ASCT2 w transporcie Gln przez błony komórkowe w obu liniach transformowanych i w pierwotnych astrocytach. Jednocześnie ujawniono znikomy udział SNAT3 w tym procesie: obniżenie ekspresji mRNA kodującego SNAT3 w kwaśnym środowisku, czy też wyciszenie mRNA metodą siRNA nie skutkowało zmianami w całkowitym wychwycie glutaminy, ani w wychwycie za pośrednictwem układu N.
6. Wyciszenie genu kodującego SNAT3 pociągało za sobą jedynie umiarkowany spadek szybkości procesu namnażania komórek linii glejaka T98G. Ponadto zablokowanie genu kodującego ten transporter nie wpływało na indeks proliferacji komórek glejaka.
7. W sumie uzyskane dane przemawiają za mało znaczącą rolą transportera SNAT3 w kształtowaniu fenotypu glejaków *in vitro*.

VIII. STRESZCZENIE

Zawartość Gln znacząco przewyższa stężenie innych aminokwasów w płynie mózgowo - rdzeniowym. Wśród ról swoiście pełnionych przez Gln w OUN w pierwszym rzędzie wyróżnia się jej udział w tworzeniu neuroprzekaźników: pobudzającego kwasu glutaminowego oraz hamującego kwasu γ -aminomasłowego. Ponadto Gln pełni ważne funkcje metaboliczne w komórce. Na uwagę zasługuje jej udział w neutralizacji amoniaku a także w energetyce komórkowej - powstający z niej Glu ulega deaminacji do α -ketoglutaranu, który jest pośrednim metabolitem w cyklu Krebsa. Ponadto Gln stanowi źródło azotu w biosyntezie aminokwasów, białek oraz nukleotydów. Z tego względu, co istotne w kontekście niniejszej pracy, zapotrzebowanie na ten aminokwas rośnie w komórkach zmienionych nowotworowo, gdzie metabolizm komórkowy jest znacznie wzmożony. Wzrostowi zapotrzebowania na Gln towarzyszy, udokumentowany w rozlicznych doniesieniach, jej zwiększony transport przez błony komórek nowotworowych. Mechanizm ten wiąże się z nadreprezentacją białek transportujących Gln. Powszechnie obserwowanym zjawiskiem w wielu nowotworach jest nadekspresja mRNA kodującego transporter ASCT2 należący do układu ASC. Możliwość wykorzystywania badań nad poziomem ekspresji transporterów Gln w diagnostyce nowotworów, a także bogata wiedza na temat roli Gln w procesie nowotworzenia skłoniły do podjęcia prób analizy ekspresji genów kodujących białka należące do układów swoiście transportujących ten aminokwas. Badania przeprowadzono na guzach OUN o najwyższym stopniu złośliwości, takich jak gwiaździak anaplastyczny (*astrocytoma anaplasticum*, o III stopniu złośliwości wg WHO) oraz glejak wielopostaciowy (*glioblastoma multiforme*, o IV stopniu złośliwości wg WHO). Analizy porównawcze wykonano na przerzutach innych nowotworów do OUN oraz na pojedynczym przypadku guza - skąpodrzewiaka (*oligodendroglioma*, o II stopniu złośliwości wg WHO). Ponadto przeprowadzono badania na hodowlach pierwotnych wyprowadzonych z badanych guzów, a także na linii glejaka ludzkiego T98G, glejaka szczurzego C6 oraz na hodowlach pierwotnych astrocytów szczura. Skupiono uwagę na przedstawicielach trzech układów: N, ASC oraz A,

wyróżniających się znaczną swoistością wobec Gln. W celu analizy ekspresji mRNA kodujących poszczególne transportery wykorzystano technikę RT-PCR.

Nowym spostrzeżeniem było stwierdzenie swoistej nadekspresji przedstawiciela układu N – transportera SNAT3 w glejakach o najwyższym stopniu złośliwości, natomiast w wyprowadzonych z nich hodowlach pierwotnych zaobserwowano spadek poziomu ekspresji mRNA dla tego transportera. W przypadku innego przedstawiciela układu N – transportera SNAT5 nie zaobserwowano zmian poziomu mRNA w glejakach złośliwych, stwierdzono jednak spadek jego ekspresji w hodowlach wyprowadzonych z glejaków. Nadreprezentację transportera ASCT2 stwierdzono we wszystkich badanych guzach OUN oraz w przerzutach nowotworów narządów obwodowych do OUN. Obserwacja ta stanowi potwierdzenie doniesień dotyczących wielu typów nowotworów, a ich istotnym uzupełnieniem jest wykazanie, że wysoka ekspresja ASCT2 utrzymuje się w hodowlach wyprowadzonych z badanych guzów OUN. W przypadku przedstawiciela układu A (SNAT1) nie stwierdzono znaczących zmian ani w przerzutach nowotworów do OUN, ani w guzach o najwyższym stopniu złośliwości, ani też w hodowlach wyprowadzonych z tych ostatnich.

Wybiórcza nadreprezentacja w glejakach złośliwych OUN transportera SNAT3, należącego do najbardziej swoistego dla Gln układu, a także zaobserwowany wzrost jego ekspresji w hodowli pierwotnej astrocytów pod wpływem karcynogenu, zrodziły pytanie, jaką rolę odgrywa ten transporter w procesie nowotworzenia? Aktualne doniesienia na temat znaczenia SNAT3 jako regulatora pH w innym schorzeniu - kwasicy metabolicznej w nerce, mogły sugerować jego podobną rolę w glejakach. Przypuszczenia te z kolei wzmocniła wiedza dotycząca innej niż w prawidłowych astrocytach regulacji pH w glejakach i jej znaczenia dla procesu nowotworzenia: zachowanie niskiego pH zewnątrzkomórkowego (pHe) i wysokiego pH wewnątrzkomórkowego (pHi) promuje ekspansję i przeżywalność glejaków. Badania na liniach komórkowych: glejaka T98G i C6 oraz na hodowli pierwotnej astrocytów wykazały swoistą wrażliwość ekspresji SNAT3 na obniżenie pH medium hodowlanego. W tych warunkach doświadczalnych wykonano również pomiar wewnątrzkomórkowego pH: zaobserwowano nieznaczny wzrost pHi w przypadku dwóch badanych linii glejaków: C6 i T98G i znamiennej statystycznie wzrost pHi w hodowli pierwotnej astrocytów. Badania z użyciem inhibitora kluczowego regulatora pH w glejakach,

wymiennika Na^+/H^+ , wykazały zwiększenie ekspresji transportera SNAT3 w badanych liniach glejaka. Zaobserwowano również, że zablokowanie wymiennika Na^+/H^+ nie miało wpływu na pH_i w linii glejaka T98G i w hodowli pierwotnej astrocytów. Te dwie ostatnie obserwacje mogłyby sugerować przejęcie funkcji wymiennika przez SNAT3 w regulacji pH w glejakach. Hipoteza ta wymaga jednak dalszych badań.

Aby zbadać molekularny mechanizm spadku ekspresji mRNA dla transportera Gln po zastosowaniu niskiego pH użyto inhibitora polimerazy RNA II - 5-6-dichloro-1- β -rybofuranozylobenzoimidazolu (DRB). Zastosowanie tego inhibitora pozwala na zaobserwowanie zmian ekspresji odpowiadających zmianom stabilności mRNA. Wykazano, że zarówno w obecności jak i przy braku DRB, po zadziałaniu obniżonym pH spada ekspresja mRNA kodującego SNAT3, a także, że spadek ekspresji tego mRNA jest silniejszy przy braku DRB w obniżonym pH, niż w jego obecności w pH kontrolnym, co sugeruje, że za zmniejszenie poziomu mRNA w niskim pH odpowiedzialne jest przede wszystkim zmniejszenie stabilności mRNA dla SNAT3.

Zbadano również transport Gln do komórek w warunkach obniżonej ekspresji transportera SNAT3, a zatem przy niskim pH medium i po wyciszeniu genu z użyciem metody siRNA. W obu przypadkach nie wykazano zmian w wychwycie Gln, co świadczy o łatwej zastępowalności SNAT3 przez inne transportery, a zatem o zdolności adaptacyjnej układów transportujących ten aminokwas.

Funkcjonalna rola SNAT3 w procesach ściśle powiązanych z nowotworzeniem zbadana została po wyciszeniu ekspresji genu kodującego ten transporter w komórkach T98G. W tych warunkach doświadczalnych analizowano indeks proliferacji komórek oraz proces ich namnażania. W przypadku tego pierwszego badania nie stwierdzono udziału transportera SNAT3 w proliferacji komórek. Zaobserwowano natomiast spadek namnażania komórek w warunkach wyciszenia mRNA kodującego SNAT3.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki nie wyjaśniają jednoznacznie funkcji transportera SNAT3 w nowotworzeniu. Zbadanie jego roli w tym procesie będzie wymagało dalszych badań, w tym na guzach *in situ*.

W niniejszej pracy podjęto ponadto próbę odpowiedzi na pytanie, jaki jest mechanizm regulacji ekspresji genu transportera SNAT3. W obliczu rozlicznych

prac dotyczących roli PI3K w przeżywalności glejaków, a także najnowszych doniesień na temat regulacji ekspresji genów transporterów układu N przez szlak sygnałowy inicjowany przez PI3K, postanowiono zbadać wpływ zahamowania PI3K zarówno na przeżywalność komórek glejaka *in vitro*, jak i na ekspresję transporterów Gln. Po zastosowaniu inhibitora PI3K zaobserwowano spadek żywotności komórek (test MTT) oraz stwierdzono inicjację procesu apoptozy. Zaobserwowano zmniejszenie ekspresji mRNA kodujących transportery: SNAT1 i SNAT3. O ile w przypadku tego pierwszego zjawisko pozytywnej regulacji przez szlak inicjowany przez PI3K jest zjawiskiem poznanym i opisanym w literaturze, o tyle w przypadku SNAT3 - przedmiotu zainteresowania niniejszej rozprawy, obserwacja ta jest nowa.

IX. LITERATURA

1. Albrecht J, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe A (2007) Glutamine in the central nervous system: function and dysfunction. *Front Biosci* 12: 332-343
2. Aoki M, Batista O, Bellacosa A, Tschlis P, Vogt PK (1998) The akt kinase: molecular determinants of oncogenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14950-14955
3. Ardawi MS, Newsholme EA (1983) Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. *Biochem J* 21: 835-842
4. Armano S, Coco S, Bacci A, Pravettoni E, Schenk U, Verderio C, Varoqui H, Erickson JD, Matteoli M (2002) Localization and functional relevance of system A neutral amino acid transporters in cultured hippocampal neurons. *J Biol Chem* 277: 10467-10473
5. Arriza JL, Kavanaugh MP, Fairman WA, Wu YN, Murdoch GH, North RA, Amara SG (1993) Cloning and expression of a human neutral amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family. *J Biol Chem* 268: 15329-15332
6. Baeza N, Weller M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (2003) PTEN methylation and expression in glioblastomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 106: 479-485
7. Bain PJ, LeBlanc-Chaffin R, Chen H, Palii SS, Leach KM, Kilberg MS (2002) The mechanism for transcriptional activation of the human ATA2 transporter gene by amino acid deprivation is different than that for asparagine synthetase. *J Nutr* 132: 3023-3029
8. Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS (2006) The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem* 98: 641-653
9. Bannai S, Kitamura E (1980) Transport interaction of L-cystine and L-glutamate in human diploid fibroblasts in culture. *J Biol Chem* 255: 2372-2376
10. Boado RJ, Li JY, Nagaya M, Zhang C, Pardridge WM (1999) Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *PNAS* 96: 12079-12084

11. Bode B, Tamarappoo BK, Mailliard M, Kilberg MS (1990) Characteristics and regulation of hepatic glutamine transport. *J Parent Enteral Nutr* 14: 51S-55S
12. Bode BP, Souba WW (1994) Modulation of cellular proliferation alters glutamine transport and metabolism in human hepatoma cells. *Ann Surg* 220: 411-422
13. Bode BP, Kamiński DL, Souba WW, Li AP (1995) Glutamine transport in isolated human hepatocytes and transformed liver cells. *Hepatology* 21: 511-520
14. Bode BP, Fuchs BC, Hurley BP, Conroy JL, Suetterlin JE, Tanabe KK, Rhoads DB, Abcouwer SF, Souba WW (2002) Molecular and functional analysis of glutamine uptake in human hepatoma and liver-derived cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283: F062-G1073
15. Boulland JL, Osen KK, Levy LM, Danbolt NC, Edwards RH, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA (2002) Cell-specific expression of the glutamine transporter SN1 suggests differences in dependence on the glutamine cycle. *Eur J Neurosci* 15: 1615-1631
16. Boulland JL, Rafiki A, Levy LM, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA (2003) Highly differential expression of SN1, a bidirectional glutamine transporter, in astroglia and endothelium in the developing rat brain. *Glia* 413: 260-275
17. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
18. Bröer A, Brookes N, Ganapathy V, Dimmer KS, Wagner CA, Lang F, Bröer S (1999) The astroglial ASCT2 amino acid transporter as a mediator of glutamine efflux. *J Neurochem* 73: 2184-2194
19. Bröer S, Brookes N (2001) Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. *J Neurochem* 77: 705-719
20. Bröer A, Albers A, Iwan Setiawan I, Edwards RH, Chaudhry FA, Lang F, Wagner CA, Bröer S (2002) Regulation of the glutamine transporter SN1 by extracellular pH and intracellular sodium ions. *J Physiol* 539: 3-14
21. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296: 550-553
22. Brunet A, Bonni A, Zigmund MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96: 857-868

23. Buschges R, Weber RG, Actor B, Lichter P, Collins VP, Reifenberger G (1999) Amplification and expression of cyclin D genes (CCND1, CCND2 and CCND3) in human malignant gliomas. *Brain Pathol* 9: 435-442
24. Cantley LC, Neel BG (1999) New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4240-4245
25. Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296: 655-1657
26. Carretero J, Obrador E, Anasagasti MJ, Martin JJ, Vidal-Vanaclocha F, Estrela JM (1999) Growth-associated changes in glutathione content correlate with liver metastatic activity of B16 melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 17: 567-574
27. Chaudhry FA, Reimer RJ, Krizaj D, Barber D, Storm-Mathisen J, Copenhagen DR, Edwards RH (1999) Molecular analysis of system N suggests novel physiological roles in nitrogen metabolism and synaptic transmission. *Cell* 99: 769-780
28. Chaudhry FA, Krizaj D, Larsson P, Reimer RJ, Wreden Ch, Storm-Mathisen J, Copenhagen D, Kavanaugh M, Edwards RH (2001) Coupled and uncoupled proton movement by amino acid transport system N. *EMBO J* 20: 7041-7051
29. Chaudhry FA, Schmitz D, Reimer RJ, Larsson P, Gray AT, Nicoll R, Kavanaugh M, Edwards RH (2002) Glutamine uptake by neurons: interaction of protons with System A transporters. *J Neurosci* 22: 62-72
30. Choe G, Horvath S, Cloughes TF, Crosby K, Seligson D, Palotie A, Inge L, Smith BL, Sawyers ChL, Mischel PS (2003) Analysis of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma patients *in vivo*. *Cancer Research* 66: 2742-2746
31. Chomczyński P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159
32. Chow A, Zhang R (1998) Glutamine reduces heat shock-induced cell death in rat intestinal epithelial cells. *J Nutr* 128: 1296-1301
33. Christensen HN, Liang M (1965) An amino acid transport system of unassigned function in the Ehrlich ascites tumor cell. *J Biol Chem* 240: 3601-3608
34. Christensen HN, Oxender DL, Liang M, Vatz KA (1965) The use of *N*-methylation to direct the route of mediated transport of amino acids. *J Biol Chem* 240: 3609-3616

35. Christensen HN (1990) Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev* 70: 43-77
36. Chung WJ, Lyons SA, Nelson GM, Hamza H, Gladson CL, Gillespie GY, Sontheimer H (2005) Inhibition of cystine uptake disrupts the growth of primary brain tumors. *J Neurosci* 25: 7101-7110
37. Collins CL, Wasa M, Souba, Abcouwer SF (1998) Determinants of glutamine dependence and utilization by normal and tumor-derived breast cell lines. *J Cell Physiol* 176: 166-178
38. Cubelos B, Gonzalez-Gonzalez IM, Gimenez C, Zafra F (2005) Amino acid transporter SNAT5 localizes to glial cells in the rat brain. *Glia* 49: 230-244
39. Curi R, Newsholme P, Pithon-Curi TC, Pires-de-Melo M, Garcia C, Homem-de-Bittencourt Junior PI, Guimaraes AR (1999) Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. *Braz J Med Biol Res* 32: 3215-3221
40. Curthoys NP, Gstraunthaler G (2001) Mechanism of increased renal gene expression during metabolic acidosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F381-F390
41. Curthoys NP, Tang A, Gstraunthaler G (2001) pH regulation of renal gene expression. *Novartis Found Symp* 240: 100-111
42. Daikhin Y, Yudkoff M (2000) Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *J Nutr* 130: 1026S-1031S
43. de Groot JF, Liu TJ, Fuller G, Yung WK (2005) The excitatory amino acid transporter-2 induces apoptosis and decreases glioma growth in vitro and in vivo. *Cancer Res* 65: 1934-1940
44. Dolińska M, Dybel A, Albrecht J (1999) Glutamine transport in C6 glioma cells. *Neurochem Int* 37: 139-146
45. Dolińska M, Dybel A, Hilgier W, Zielińska M, Zabłocka B, Buzanska L, Albrecht J (2001) Glutamine transport in C6 glioma cells: substrate specificity and modulation in a glutamine deprived culture medium. *J Neurosci Res* 66: 959-966
46. Dolińska M, Dybel A, Zabłocka B, Albrecht J (2003) Glutamine transport in C6 glioma cells shows ASCT2 system characteristics. *Neurochem Int* 43: 501-507
47. Dropcho EJ, Soong SJ (1996) The prognostic impact of prior low grade histology in patients with anaplastic gliomas: a case-control study. *Neurology* 47: 684-690

48. Duerr EM, Rollbrocker B, Hayashi Y, Peters N, Meyer-Puttlitz B, Louis DN, Schramm J, Wiestler OD, Parsons R, Eng C, von Deimling A (1998) PTEN mutations in gliomas and glioneuronal tumors. *Oncogene* 16: 2259-2264
49. Eagle H, Oyama VI, Levy M, Horton CL, Fleischman R (1956) The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid. *J Biol Chem* 218: 607-616
50. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68: 383-424
51. Ennis SR, Kawai N, Ren XD, Abdelkarim GE, Keep RF (1998) Glutamine uptake at the blood-brain barrier is mediated by System-N transport. *J Neurochem* 71: 2565-2573
52. Erecińska M, Silver IA (1990) Metabolism and the role of glutamate in mammalian brain. *Progr Neurobiol* 35: 245-296
53. Fan XC, Steitz JA (1998) Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *EMBO J* 17: 3448-3460
54. Fei YJ, Sugawara M, Nakanishi T, Huang W, Wang H, Prasad PD, Leibach FH, Ganapathy V (2000) Primary structure, genomic organization, and functional and electrogenic characteristics of human system N 1, a Na⁺- and H⁺-coupled glutamine transporter. *J Biol Chem* 275: 23707-23717
55. Fingar DC, Blenis J (2004) Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 23: 3151-3171
56. Fischer CP, Bode BP, Souba WW (1998) Adaptive alterations in cellular metabolism with malignant transformation. *Ann Surg* 5: 627-636
57. Fuchs BC, Perez Ch, Suetterlin JE, Chaudhry SB, Bode BP (2004) Inducible antisense RNA targeting amino acid transporter ATB0/ASCT2 elicits apoptosis in human hepatoma cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286: G467-G478
58. Fuchs BC, Bode BP (2005) Amino acid transporters ASCT2 and LAT1 in cancer: Partners in crime? *Sem Canc Biol* 15: 254-266
59. Fuchs BC, Bode BP (2006) Stressing out over survival: glutamine as an apoptotic modulator. *J Surg Res* 131: 26-40
60. Gallo V, Ghiani CA (2000) Glutamate receptors in glia: New cells, new inputs and new functions. *Trends Pharmacol Sci* 21: 252-258

61. Gazzola RF, Sala R, Bussolati O, Visigalli R, Dall'Asta V, Ganapathy V, Gazzola GC, (2001) The adaptive regulation of amino acid transport system A is associated to changes in ATA2 expression. *FEBS Lett* 490: 11-14.
62. Goldenberg GJ, Lam HY, Begleiter A (1979) Active carrier-mediated transport of melphalan by two separate amino acid transport systems in LPC-1 plasmacytoma cells in vitro. *J Biol Chem* 254: 1057-1064
63. Gottlieb RA, Nordberg J, Skowronski E, Babior BM (1996) Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 654-658
64. Greig NH, Momma S, Sweeney DJ, Smith QR, Rapoport SI (1987) Facilitated transport of melphalan at the rat blood-brain barrier by the large neutral amino acid carrier system. *Cancer Res* 47: 1571-1576
65. Griffiths R (1991) Are cancer cells acidic? *Br J Cancer* 64: 425-427
66. Gu S, Roderick HL, Camacho P, Jiang JX (2000) Identification and characterization of an amino acid transporter expressed differentially in liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3230-3235
67. Gu S, Langlais P, Liu F, Jiang JX (2003) Mouse system-N amino acid transporter, mNAT3, expressed in hepatocytes and regulated by insulin-activated and phosphoinositide 3-kinase-dependent signalling. *Biochem J* 371: 721-731
68. Gu S, Villegas CJ, Jiang JX (2005) Differential regulation of amino acid transporter SNAT3 by insulin in hepatocytes. *J Biol Chem* 280: 26055-26062
69. Hall JC, Heel K, McCauley R (1996) Glutamine. *British J Surg* 83: 305-312
70. Hamberger A, Chiang GH, Nylén G, Scheff SW, Cotman CW (1979) Glutamate as a CNS transmitter. I. Evaluation of glucose and glutamine as precursors for the synthesis of preferentially released glutamate. *Brain Res* 168: 513-530
71. Hamberger A, Nyström B (1984) Extra- and intracellular amino acids in the hippocampus during development of hepatic encephalopathy. *Neurochem Res* 9: 1181-1192
72. Hansen WR, Barsic-Tress N, Taylor L, Curthoys NP (1996) The 3'-nontranslated region of rat renal glutaminase mRNA contains a pH-responsive stability element. *Am J Physiol* 271: F126-F131
73. Hargreaves KM, Pardridge WM (1988) Neutral amino acid transport at the human blood-brain barrier. *J Biol Chem* 263: 19392-19397

74. Hatanaka T, Huang W, Wang H, Sugawara M, Prasad PD, Leibach FH, Ganapathy V, (2000) Primary structure, functional characteristics and tissue expression pattern of human ATA2, a subtype of amino acid transport system A. *Biochim Biophys Acta* 1467: 1-6
75. Heckel T, Broer A, Wiesinger H, Lang F, Broer S (2003) Asymmetry of glutamine transporters in cultured neural cells. *Neurochem Int* 43: 289-298
76. Hegde M, Roscoe J, Cala P, Gorin F (2004) Amiloride kills malignant glioma cells independent of its inhibition of the sodium-hydrogen exchanger. *J Pharmacol Exp Ther* 310: 67-74
77. Hertz L, Muthy CRK, Schousboe A (1988) Metabolism of glutamate and related amino acid. In: The biochemical pathology of astrocytes. *New York:Liss*: 395-406
78. Hertz L, Juurlink BHJ, Hertz E, Fosmark H, Schousboe AS (1989) Preparation of primary cultures of mouse (rat) astrocytes. A Dissection and Tissue Culture Manual for the Nervous System. (Shahar A, DeVellis J, Vernadakis A, Haber, B) Alan R. Liss, New York, 105-108
79. Hetman M, Cavanaugh JE, Kimelman D, Xia Z (2000) Role of glycogen synthase kinase-3beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J Neurosci* 20: 2567-2574
80. Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17: 31-108.
81. Hubesch B, Sappey-Marini D, Roth K, Meyerhoff DJ, Matson GB, and Weiner MW (1990) P-31 MR spectroscopy of normal human brain and brain tumors. *Radiology* 174: 401-409
82. Hundal HS, Rennie MJ, Watt PW (1987) Characteristics of L-glutamine transport in perfused rat skeletal muscle. *J Physiol* 393: 283-305
83. Hyde R, Peyrollier K, Hundal HS (2002) Insulin promotes the cell surface recruitment of the SAT2/ATA2 system A amino acid transporter from an endosomal compartment in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 277: 13628-13634
84. 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
85. Jacobson I, Sandberg M, Hamberger A (1985) Mass transfer in brain dialysis devices ± a new method for the estimation of extracellular amino acids concentration. *J Neurosci Methods* 15: 263-268

86. Jefferies H, Coster J, Khalil A, Bot J, McCauley RD, Hall JC (2003) Glutathione. *ANZ J Surg* 73: 517-522
87. Joy AM, Beaudry CE, Tran NL, Ponce FA, Holz DR, Demuth T, Berens ME (2003) Migrating glioma cells activate the PI3 K pathway and display decreased susceptibility to apoptosis. *J Cell Sci* 116: 4409-4417
88. Kanai Y, Segawa H, Miyamoto K, Uchino H, Takeda E, Endou H (1998) Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem* 273: 23629-23632
89. Karinch AM, Lin CM, Wolfgang ChL, Pan W, Souba WW (2002) Regulation of expression of the SN1 transporter during renal adaptation to chronic metabolic acidosis in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F1011-F1019
90. Keep RF, Xiang J (1995) N-system amino acid transport at the blood-CSF barrier. *J Neurochem* 65: 2571-2576
91. Kekuda R, Prasad PD, Fei YJ, Torres-Zamorano V, Sinha S, Yang-Feng TL, Leibach FH, Ganapathy V (1996) Cloning of the sodium-dependent, broad-scope, neutral amino acid transporter B⁰ from a human placental choriocarcinoma cell line. *J Biol Chem* 271: 18657-18661
92. Kekuda R, Torres-Zamorano V, Fei YJ, Prasad PD, Li HW, Mader LD, Leibach FH, Ganapathy V (1997) Molecular and functional characterization of intestinal Na⁺-dependent neutral amino acid transporter B⁰. *Am J Physiol* 272: G1463-G1472
93. Kilberg MS, Handlogten ME, Christensen HN (1980) Characteristics of an amino acid transport system in rat liver for glutamine, asparagine, histidine, and closely related analogs. *J Biol Chem* 255: 4011-4019
94. Kilberg MS (1986) System A-mediated amino acid transport: metabolic control at the plasma membrane. *Trends Biochem Sci* 11: 183-186
95. Kim DK, Kanai Y, Choi HW, Tangtrongsup S, Chairoungdua, Babu E, Tachampa, Anzai N, Iribe Y, Endou H (2002) Characterization of the system L amino acid transporter in T24 human bladder carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1565: 112-122
96. Kim DK, Kim IJ, Hwang S, Kook JH, Lee MC, Shin BA, Bae CS, Yoon JH, Ahn SG, Kim SA, Kanai Y, Endou H, Kim JK (2004) System L-amino acid transporters are differently expressed in rat astrocyt and C6 glioma cells. *Neurosci Res* 50: 437-446
97. Kleihues P, Cavenee WK (2000) Pathology and Genetics. Tumours of the Nervous System. ed. IARC Press, Lyon

98. Klimberg VS, Souba WW (1990) The importance of intestinal glutamine metabolism in maintaining a healthy gastrointestinal tract and supporting the body's response to injury and illness. *Surg Annu* 22: 61-76
99. Kobayashi H, Ishii Y, Takayama T (2005) Expression of L-type amino acid transportr 1 (LAT1) in esophageal carcinoma. *J Surg Onco* 90: 233-238
100. Kristof AS, Pacheco-Rodriguez G, Schremmer B, Moss J (2005) LY303511 (2-piperazinyl-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one) acts via phosphatidylinositol 3-kinase-independent pathways to inhibit cell proliferation via mammalian target of rapamycin (mTOR)- and non-mTOR-dependent mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 14: 1134-1143
101. Laake JH, Takumi Y, Eidet J, Torgner IA, Roberg B, Kvamme, Ottersen OP (1999) Postembedding immunogold labelling reveals subcellular localization and pathway-specific enrichment of phosphate activated glutaminase in rat cerebellum. *Neuroscience* 88: 1137-1151
102. Lakshmanan M, Goncalves E, Lessly G, Foti D, Robbins J (1990) The transport of thyroxine into mouse neuroblastoma cells, NB41A3: the effect of L-system amino acids. *Endocrinology* 126: 3245-3250
103. Laterza OF, Curthoys NP (2000) Effect of acidosis on the properties of the glutaminase mRNA pH-response element binding protein. *J Am Soc Nephrol* 11: 1583-1588
104. Lehre KP, Danbolt NC (1998) The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J Neurosci* 18: 8751-8757
105. Leśniak MS, Brem H (2004) Targeted therapy for brain tumours. *Nat Rev Drug Discov* 3: 499-508
106. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareisis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R (1997) PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275: 1943-1947.
107. Li R, Younes M, Frolov A, Wheeler TM, Scardino P, Ohori M, Ayala G (2003) Expression of neutral amino acid transporter ASCT2 in human prostate. *Anicancer Res* 23: 3414-3418
108. Ling R, Bridges CC, Sugawara M, Fujita T, Leibach FH, Prasad PD, Ganapathy V (2001) Involvement of transporter recruitment as well as gene expression in the substrate-induced adaptive regulation of amino acid transport system A. *Biochim Biophys Acta* 151: 15-21
109. Lobo C, Ruiz-Bellido MA, Aledo JC, Marquez J, Nunez 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
110. Mackenzie B, Schäfer MK, Erickson JD, Hediger MA, Weihe E, Varoqui H (2003) Functional properties and cellular distribution of the System A glutamine transporter SNAT1 support specialized roles in central neurons. *J Biol Chem* 278: 23720–23730
 111. Mackenzie B, Erickson JD (2004) Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflugers Arch* 447: 784-795
 112. Madshus IH (1988) Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. *Biochem J* 250: 1-8
 113. Maehama T, Dixon JE (1998) The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 273: 13375–13378
 114. Maehama T, Dixon JE (1999) PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends Cell Biol* 9: 125–128
 115. Magistretti PJ, Pellerin L, Rothman DL, Shulman RG (1999) Energy on demand. *Science* 283: 496-497
 116. Mariani L, Beaudry C, McDonough WS, Hoelzinger DR, Demuth T, Ross KR, Berens T, Coons SW, Watts G, Trent JM, Wei JS, Giese A, Berens ME (2001) Glioma cell motility is associated with reduced transcription of proapoptotic and proliferation genes: a cDNA microarray analysis. *J Neurooncol* 53: 161-176
 117. Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD (1977) Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science* 195: 1356-1358
 118. McFerrin MB, Sontheimer H (2006) A role for ion channels in glioma cell invasion. *Neuron Glia Biol* 2: 39-49
 119. McGale EH, Pye IF, Stonier C, Hutchinson EC, Aber GM (1977) Studies of the inter-relationship between cerebrospinal fluid and plasma amino acid concentrations in normal individuals. *J Neurochem* 29: 291-297
 120. McGivan JD, Pastor-Anglada M (1994) Regulatory and molecular aspects of mammalian amino acid transport. *Biochem JA* 15: 321-334
 121. McLean LA, Roscoe J, Jorgensen NK, Gorin FA, Cala PM (2000) Malignant gliomas display altered pH regulation by NHE 1 compared with nontransformed astrocytes. *Am J Physiol* 278: C676-C688

122. Medina MA, Sanchez-Jimenez F, Marquez J, Rodriguez Quesada A, Nunez de Castro I (1992) Relevance of glutamine metabolism to tumor cell growth. *Mol Cell Biochem* 113: 1-15
123. Medina V, Lorenzo A, Diaz M (2001) Electrogenic Na⁺-dependent L-alanine transport in the lizard duodenum. Involvement of systems A and ASC. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280: R612-R622
124. Meister A (1991) Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. *Pharm Ther* 51: 155-194
125. Meng Q, Xia C, Fang J, Rojanasakul Y, Jiang BH (2006) Role of PI3K and AKT specific isoforms in ovarian cancer cell migration, invasion and proliferation through the p70S6K1 pathway. *Cell Signal* 18: 2262-2271
126. Merzak A, Pilkington GJ (1997) Molecular and cellular pathology of intrinsic brain tumours. *Cancer Metastasis Rev* 16: 155-177
127. Miccoli L, Oudard S, Sureau F, Porison F, Dutrillaux B, and Poupon MF (1996) Intracellular pH governs the subcellular distribution of hexokinase in a glioma cell line. *Biochem J* 313: 957-962
128. Miura M, Sasaki T (1991) Role of glutathione in the intrinsic radioresistance of cell lines from a mouse squamous cell carcinoma. *Radiat Res* 126: 229-236
129. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63
130. Moule SK, McGivan JD (1987) Epidermal growth factor, like glucagon, exerts a short-term stimulation of alanine transport in rat hepatocytes. *Biochem J* 247: 233-235
131. Nabors LB, Gillespie GY, Harkins L, King PH (2001) HuR, a RNA stability factor, is expressed in malignant brain tumors and binds to adenine- and uridine-rich elements within the 3' untranslated regions of cytokine and angiogenic factor mRNAs. *Cancer Res* 61: 2154-2161
132. Nagane M, Shibui S, Oyama H, Asai A, Kuchino Y, Nomura K (1995) Investigation of chemoresistance-related genes mRNA expression for selecting anticancer agents in successful adjuvant chemotherapy for a case of recurrent glioblastoma. *Surg Neurol* 44: 462-468
133. Nagaraja TN, Brookes N (1996) Glutamine transport in mouse cerebral astrocytes. *J Neurochem* 66: 1665-1674
134. Nakanishi T, Sugawara M, Huang W, Martindale RG, Leibach FH, Ganapathy ME, Prasad PD, Ganapathy V (2001 a) Structure, function, and

- tissue expression pattern of human SN2, a subtype of the amino acid transport system N. *Biochem Biophys Res Commun* 281: 1343-13488.
135. Nakanishi T, Kekuda R, Fei YJ, Hatanaka T, Sugawara M, Martindale RG, Leibach FH, Prasad PD, Ganapathy V (2001 b) Cloning and functional characterization of a new subtype of the amino acid transport system N. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C1757-C1768
 136. Nawashiro H, Otani N, Shinomiya N, Fukui S, Ooigawa H, Shima K, Matsuo H, Kanai Y, Endou H (2006) L-type amino acid transporter 1 as a potential molecular target in human astrocytic tumor. *Int J Cancer* 119: 484-92
 137. Neu J, Shenoy V, Chakrabarti R (1996) Glutamine nutrition and metabolism: where do we go from here? *FASEB J* 10: 829-837
 138. Norenberg MD (1979) Distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. *J Histochem Cytochem* 27: 756-762
 139. Norenberg MD, Martinez-Hernandez A (1979) Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res* 161: 303-310
 140. Ohkame H, Masuda H, Ishii Y, Kanai Y (2001) Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 4F2 heavy chain (4F2hc) in liver tumor lesions of rat models. *J Surg Oncol* 78: 265-271
 141. Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, Angelo LS, Santee SM, Fujiwara T, Roth JA, Deisseroth AB, Zhang WW, Kruzel E, Radinsky R (1995) Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol* 15: 3032-3040
 142. Oxender D, Christensen H (1963) Distinct mediating systems for the transport of neutral amino acids by the Ehrlich cell. *J Biol Chem* 238: 3686-3699
 143. Paquette JC, Guerin PJ, Gauthier ER (2005) Rapid induction of the intrinsic apoptotic pathway by L-glutamine starvation. *J Cell Physiol* 202: 912-921
 144. Paulsen RE, Odden E, Fonnum F (1988) Importance of glutamine for gamma-aminobutyric acid synthesis in rat neostriatum in vivo. *J Neurochem* 13: 637-641
 145. Pawlik TM, Souba WW, Sweeney TJ, Bode BP (2000) Amino acid uptake and regulation in multicellular hepatoma spheroids. *J Surg Res* 1: 15-25
 146. Peitsch MC, Muller C, Tschopp J (1994) DNA fragmentation during apoptosis is caused by frequent single-strand cuts. *Nucleic Acids Res* 21: 4206-4209

147. Peng T, Colub TR, Sabatini DM (2002) The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation. *Mol Cell Biol* 22: 5575-5584
148. Pineda M, Fernandez E, Torrents D, Estevez R, Lopez C, Camps M, Lloberas J, Zorzano A, Palacin M (1999) Identification of a membrane protein, LAT-2, that Co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acid. *J Biol Chem* 274: 19738-19744
149. Prasad PD, Wang H, Huang W, Kekuda R, Rajan DP, Leibach FH, Ganapathy V (1999) Human LAT, subunit of system L amino acid transporter: molecular cloning and transport function. *Biochem Biophys Res* 255: 283-288
150. Rajan DP, Kekuda R, Huang W, Wang H, Devoe LD, Leibach FH., Prasad PD, Ganapathy V (1999) Cloning and expression of a b(0,+)-like amino acid transporter functioning as a heterodimer with 4F2hc instead of rBAT. A new candidate gene for cystinuria. *J Biol Chem* 274: 29005-29010
151. Rajan DP, Kekuda R, Huang W, Devoe LD, Leibach FH, Prasad PD, Ganapathy V (2000) Cloning and functional characterization of a Na⁺-independent, broad-specific neutral amino acid transporter from mammalian intestine. *Biochim Biophys Acta* 1463: 6-14
152. Ransom CB, O'Neal JT, Sontheimer H (2001) Volume-activated chloride currents contribute to the resting conductance and invasive migration of human glioma cells. *J Neuroscience* 21: 7674-7683
153. Rasheed A, Herndon JE, Stenzel TT, Raetz JG, Kendelhardt J, Friedman HS, Friedman AH, Bigner DD, Bigner SH, McLendon RE (2002) Molecular markers of prognosis in astrocytic tumors. *Cancer* 94: 2688-2697
154. Reifenberger G, Collins VP (2004) Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J Mol Med* 82: 656-670
155. Reimer RJ, Chaudhry FA, Gray AT, Edwards RH (2000) Amino acid transport system A resembles system N in sequence but differs in mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 7715-7720
156. Reitzer LJ, Wice BM, Kennell D (1979) Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem* 254: 2669-2676
157. Rennie MJ, Hundal HS, Babij P, MacLennan P, Taylor PM, Watt PW, Jepson M M, Millward DJ (1986) Characteristics of a glutamine carrier in skeletal muscle have important consequences for nitrogen loss in injury, infection, and chronic disease. *Lancet* 2: 1008-1012

158. Rouse K, Nwokedi E, Woodliff JE, Epstein J, Klimberg VS (1995) Glutamine enhances selectivity of chemotherapy through changes in glutathione metabolism. *Ann Surg* 221: 420-426
159. Rzeski W, Turski L, Ikonomidou C (2000) Glutamate antagonists limit tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 798: 6372-6377
160. Rzeski W, Ikonomidou C, Turski L (2002) Glutamate antagonists limit tumor growth. *Biochem Pharmacol* 64: 1195-1200
161. Sansal I, Sellers WR (2004) The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol* 22: 2954-2963
162. Sawyers CL (2003) Will mTOR inhibitors make it as cancer drugs? *Cancer Cell* 4: 343-348
163. Schneider HP, Bröer S, Bröer A, Deitmer JW (2007) Heterologous expression of the glutamine transporter SNAT3 in xenopus oocytes is associated with four modes of uncoupled transport. *J Biol Chem* (w druku)
164. Schousboe A, Hertz L, Svenneby G, Kvamme E (1979) Phosphate activated glutaminase activity and glutamine uptake in primary cultures of astrocytes. *J Neurochem* 32: 943-950
165. Segawa H, Fukasawa Y, Miyamoto K, Takeda E, Endou H, Kanai Y (1999) Identification and functional characterization of a Na⁺ – independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J Biol Chem* 274: 23740-23745
166. Shafqat S, Tamarappoo BK, Kilberg MS, Puranam RS, McNamara JO, Guadano-Ferraz A, Freneau RT (1993) Cloning and expression of a novel Na⁺- dependent neutral amino acid transporter structurally related to mammalian Na⁺/glutamate cotransporters. *J Biol Chem* 268: 15351-15355
167. Shaw G, Kamen R (1986) A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46: 659-667
168. Shennan DB, Thomson J, Gow IF, Travers MT, Barber MC (2004) L-Leucine transport in human breast cancer cells (MCF-8 and MDA-MB-231); kinetics, regulation by estrogen and molecular identity of the transporter. *Biochim Biophys Acta* 1664: 206-216
169. Sidoryk M, Matyja E, Dybel A, Zielińska M, Bogucki J, Jaskólski DJ, Liberski PP, Kowalczyk P, Albrecht J (2004) Increased expression of a glutamine transporter is a marker of malignant gliomas. *NeuroReport* 15: 575-579

170. Sidoryk M, Obara M, Albrecht J (2006) Selective decrease of SN1 (SNAT3) mRNA expression in human and rat glioma cells adapted to grow in acidic medium. *Neurochem Int* 48: 547-552
171. Smith JS, Tachibana I, Passe SM, Huntley BK, Borell TJ, Iturria N, O'Fallon JR, Schaefer PL, Scheithauer BW, James CDJ, Bucker JC, Jenkins RB (2001) PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J National Cancer Institute* 93: 1246-1256
172. Soh H, Wasa M, Wang HS, Fukuzawa M (2004) Glutamine regulates amino acid transport and glutathione levels in a human neuroblastoma cell line. *Pediatr Surg Int* 21: 29-33
173. Solbu TT, Boulland JL, Zahid W, Lyamouri Bredahl M.K, Amiry-Moghaddam M, Storm-Mathisen J, Roberg BA, Chaudhry FA (2005) Induction and targeting of the glutamine transporter SN1 to the basolateral membranes of cortical kidney tubule cells during chronic metabolic acidosis suggest a role in pH regulation. *J Am Soc Nephrol* 16: 869-877
174. Sonnewald U, Westergaard N, Schousboe A, Svendes JS, Unsgard G, Petersen SB (1993) Direct demonstration by [¹³C] NMR spectroscopy that glutamine from astrocytes is a precursor for GABA synthesis in neurons. *Neurochem Int* 22: 19-29
175. Sontheimer H (2003) Malignant gliomas: preventing glutamate and ion homeostasis for selective advantage. *TRENDS in Neurosci* 26: 543-549
176. Soroceanu L, Timothy J, Manning JR, Sontheimer H (1999) Modulation of glioma cell migration and invasion using Cl⁻ and K⁺ ion channel blockers. *J Neurosci* 19: 5942-5954
177. Souba WW (1993) Glutamine and cancer. *Ann Surg* 218: 715-728
178. Stubbs M, Veech RL, Griffiths JR (1995) Tumor metabolism: the lessons of magnetic resonance spectroscopy. *Adv Enzyme Regul* 35: 101-115
179. Stubbs M, McSheehy PM, Griffiths JR (1999) Causes and consequences of acidic pH in tumors: a magnetic resonance study. *Adv Enzyme Regul* 39: 13-30
180. Stubbs M, McSheehy PM, Griffiths JR, Bashford CL (2000) Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Mol Med Today* 6: 15-19
181. Sugawara M, Nakanishi T, Fei YJ, Huang W, Ganapathy ME, Leibach FH and Ganapathy V (2000) Cloning of an amino acid transporter with functional characteristics and tissue expression pattern identical to that of system A. *J Biol Chem* 275: 16473-16477

182. Takanaga H, Tokuda N, Ohtsuki S, Hosoya K, Terasaki T (2002) ATA2 is predominantly expressed as system A at the blood-brain barrier and acts as brain-to-blood efflux transport for L-proline. *Mol Pharmacol* 61: 1289-1296
183. 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
184. Tamai S, Masuda H, Ishii Y, Suzuki S, Kanai Y, Endou H (2001) Expression of L-type amino acid transporter 1 in rat model of liver metastasis: positive correlation with tumor size. *Cancer Detect Prev* 25: 439-445
185. Tamarappoo BK, Raizada MK, Kilberg MS (1997) Identification of a system N-like Na⁺-dependent glutamine transport activity in rat brain neurons. *J Neurochem* 68: 954-960
186. Tinto A, Gabernet C, Vives J, Prats E, Cairo JJ, Cornudella L, Godia F (2002) The protection of hybridoma cells from apoptosis by caspase inhibition allows culture recovery when exposed to non-inducing conditions. *J Biotechnol* 95: 205-214
187. Uchino H, Kanai Y, Kim do K, Wempe MF, Chairoungdua A, Morimoto E, Anders MW, Endou H (2002) Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): insights into the mechanisms of substrate recognition. *Mol Pharmacol* 61: 729-737
188. Utsunomiya-Tate N, Endou H, Kanai Y (1996) Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na⁺-dependent neutral amino acid transporter. *J Biol Chem* 271: 14883-14890
189. Vanhaesebroeck B, Waterfield MD (1999) Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* 253: 239-254
190. Varoqui H, Zhu H, Yao D, Ming H, Erickson JD (2000) Cloning and functional identification of a neuronal glutamine transporter. *J Biol Chem* 275: 4049-4054
191. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P (1989) Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* 49: 6449-6465
192. Veyrune JL, Campbell GP, Wiseman J, Blanchard JM, Hesketh JE (1996) A localisation signal in the 3' untranslated region of c-myc mRNA targets c-myc mRNA and beta-globin reporter sequences to the perinuclear cytoplasm and cytoskeletal-bound polysomes. *J Cell Sci* 109: 1185-1194
193. Vogt PK (2001) PI 3-kinase, mTOR, protein synthesis and cancer. *Trends Mol Med* 7: 482-484

194. von Deimling A, Eibl RH, Ohgaki H, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Kleihues P, Chung RY, Wiestler OD, Seizinger BR (1992) p53 mutations are associated with 17p allelic loss in grade II and grade III astrocytoma. *Cancer Res* 52: 2987-2990
195. Wang H, Huang W, Sugawara M, Devoe LD, Leibach FH, Prasad PD, Ganapathy V (2000) Cloning and functional expression of ATA1, a subtype of amino acid transporter A, from human placenta. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 1175-1179
196. Waniewski RA, Martin DL (1986) Exogenous glutamate is metabolized to glutamine and exported by rat primary astrocyte cultures. *J Neurochem* 47: 304-313
197. Wasa M, Bode BP, Abcouwer SF, Collins CL, Tanabe KK, Souba WW (1996 a) Glutamine as a regulator of DNA and protein biosynthesis in human solid tumor cell lines. *Ann Surg* 224: 189-197
198. Wasa M, Bode BP, Souba WW (1996 b) Adaptive regulation of amino acid transport in nutrient-deprived human hepatomas. *Am J Surg* 171: 163-169
199. Wasa M, Wang HS, Okada A (2002) Characterization of L-glutamine transport by a human neuroblastoma cell line. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C1246-C1253
200. Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1996) Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 3: 217-223
201. Wischmeyer PE, Musch MW, Madonna MB, Thisted R, Chang EB (1997) Glutamine protects intestinal epithelial cells: role of inducible HSP70. *Am J Physiol* 272: G879-G884
202. Wischmeyer PE, Kahana M, Wolfson R, Ren H, Musch MM, Chang E (2001) Glutamine reduces cytokine release, organ damage, and mortality in a rat model of endotoxemia. *Shock* 16: 398-402
203. Wischmeyer PE (2002) Glutamine and heat shock protein expression. *Nutrition* 18: 225-228
204. Witte D, Ali N, Carlson N, Younes M (2002) Overexpression of the neural amino acid transporter ASCT2 in human colorectal adenocarcinoma. *Anticancer Res* 22: 2555-2557
205. Wong AJ, Bigner SH, Bigner DD, Kinzler KW, Hamilton SR, Vogelstein B (1987) Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 6899-6903

206. Wu Q, Sidoryk M, Zielińska M, Albrecht J, Aschner M (2005) Acrylamide stimulates glutamine uptake in Fischer 344 rat astrocytes by a mechanism involving upregulation of the amino acid transport system N. *Ann NY Acad Sci* 1053: 435-443
207. Xiang J, Fowkes RL, Keep RF (1998) Choroid plexus histidine transport. *Brain Res* 783: 37-43
208. Xiang J, Ennis RS, Abdelkarim GA, Fujisawa M, Kawai N, Keep RF (2003) Glutamine transport at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Neurochem Int* 43: 279-288
209. Xu GY, McAdoo DJ, Hughes MG, Robak G, de Castro RJr (1998) Considerations in the determination by microdialysis of resting extracellular amino acid concentrations and release upon spinal cord injury. *Neuroscience* 86: 1011-1021
210. Yamauchi K, Komatsu T, Kulkarni AD, Ohmori Y, Minami H, Ushiyama Y, Nakayama M, Yamamoto S (2002) Glutamine and arginine affect Caco-2 cell proliferation by promotion of nucleotide synthesis. *Nutrition* 18: 329-333
211. Yanagida O, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim DK, Segawa H, Nii T, Ca SH, Matsuo H, Fukushima J, Fukasawa Y, Tani Y, Taketani Y, Uchino H, Kim JY, Inatomi J, Okayasu I, Miyamoto K, Takeda E, Goya T, Endou H (2001) Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1514: 291-302
212. Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ (1995) Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80: 285-291
213. Yao D, Mackenzie B, Ming H, Varoqui H, Zhu H, Hediger MA, Erickson JD (2000) A novel System A isoform mediating Na⁺/neutral amino acid cotransport. *J Biol Chem* 275: 22790-22797
214. 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
215. Ye ZC, Sontheimer H (1999) Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. *Cancer Res* 59: 4383-4391
216. Zanchin G, Rigotti P, Dussini N, Vassanelli P, Battistin L (1979) Cerebral amino acid levels and uptake in rats after portocaval anastomosis: II. Regional studies in vivo. *J Neurosci Res* 4: 301-310

217. Zetterberg A, Engstrom W (1981) Glutamine and the regulation of DNA replication and cell multiplication in fibroblasts. *J Cell Physiol* 108: 365-373