

Streszczenie wykładu: „Czy manipulowanie poziomem glutaminaz wspomogę terapię antyglejakaową?”

Glejaki są nowotworami ośrodkowego układu nerwowego wywodzącymi się z różnych typów komórek glejowych: astrocytów, oligodendrocytów i ependymocytów, stanowiącymi ponad 70% wszystkich guzów mózgu. Klasyfikacja stworzona przez Światową Organizację Zdrowia (World Health Organization, WHO) dzieli te nowotwory na glejaki o niskim stopniu złośliwości (WHO I i II) oraz glejaki złośliwe (WHO III i IV). Co roku diagnozuje się około 6 przypadków glejaków na 100 000 mieszkańców. Dane epidemiologiczne sugerują, że czynnikami związanymi ze wzmożonym ryzykiem zachorowania na te nowotwory mogą być ekspozycja na promieniowanie rentgenowskie, niektóre syndromy genetyczne (nerofibromatoza typu I i II; syndrom Li-Fraumeni), urazy głowy. Do tej pory nie ma jednak dowodów jednoznacznie wskazujących na związek pomiędzy którymkolwiek z wymienionych czynników a etiologią glejaków.

Pomimo postępu medycyny, złośliwe glejaki są chorobą nieuleczalną o bardzo złych rokowaniach: w przypadku glejaka o III stopniu złośliwości rok od postawienia diagnozy przeżywa 60% pacjentów, a 5 lat przeżywa już tylko niespełna 30% pacjentów. Jeszcze gorsze rokowania ma glioblastoma - najczęstszy i jednocześnie najbardziej złośliwy glejak (IV stopień złośliwości): rok od postawienia diagnozy przeżywa ok. 30% pacjentów, natomiast 5 lat ma szansę przeżyć raptem 4% pacjentów. Tak złe rokowania wynikają głównie z intensywnej proliferacji komórek glejaka wzrastającej wraz ze stopniem złośliwości guza oraz ze zdolności komórek do naciekania zdrowych tkanek. To charakterystyczne dla złośliwych glejaków zjawisko infiltracji powoduje, że trudno odnaleźć granicę między zdrową a chorą tkanką, co znacznie utrudnia dokładną i skuteczną resekcję guza. Ponadto glejaki charakteryzuje wysoka oporność na radio- i chemioterapię, a stosowane chemioterapeutyki wywołują szereg działań ubocznych obniżając znacząco jakość życia pacjentów. Konieczne są zatem intensywne badania zarówno nad potencjalnymi celami terapeutycznymi, jak i skutecznymi chemioterapeutykami, które nie działałyby cytotoksycznie na zdrowe tkanki.

Poszczególne typy glejaków różnią się między sobą szeregiem mutacji genetycznych. Obecnie w diagnostyce złośliwych glejaków wykorzystywane są trzy markery molekularne:

- 1). kodecja 1p/19q charakterystyczna dla guzów oligodendroglejowych jest korzystnym czynnikiem prognostycznym;
- 2). mutacja w obrębie genu IDH1 również stanowi korzystny czynnik prognostyczny;
- 3). metylacja promotora genu *MGMT* kodującego białko naprawiające DNA wiąże się z dłuższym czasem przeżycia pacjentów poddanych terapii związkami alkilującymi.

W badaniach prowadzonych w Zakładzie Neurotoksykologii IMDiK PAN skupiliśmy się na udziale poszczególnych elementów cyklu glutamina (Gln) - glutaminian (Glu) w kształtowaniu własności biologicznych (fenotypu) komórek glejaków. Podobnie jak to ma miejsce w komórkach nowotworowych zasiedlających tkanki poza ośrodkowym układem nerwowym, Gln w komórkach glejaka jest intensywniej niż w tkankach normalnych wykorzystywana w procesie proliferacji jako jeden z podstawowych substratów energetycznych, a także źródło atomów azotu wykorzystywanych do syntezy nukleotydów i białek. Ponadto aminokwas ten jest zarówno niezbędny, jak i wystarczający do regulacji objętości komórek glejaka, przez co pośrednio uczestniczy w procesie migracji tych komórek.

Intensywny metabolizm Gln w komórkach glejaka możliwy jest dzięki wzmożonemu transportowi tego aminokwasu przez błonę komórkową oraz wysokiej aktywności glutaminazy (GA), enzymu katabolizującego Gln do Glu i jonów amonowych. Wzmożony metabolizm Gln obserwowany w komórkach glejaków prowadzi do intensywnej produkcji Glu. Uwalniany w dużych ilościach Glu ma ogromne znaczenie dla wzrostu guza oraz migracji komórek: niszczy zdrowe neurony otaczające guz torując w ten sposób drogę rozrastającej się tkance nowotworowej. Wydzielanie dużych ilości Glu przez komórki glejaka wynika z zaburzonego transportu tego aminokwasu. Glu jest prekursorem jednego z podstawowych antyoksydantów komórkowych, glutationu (GSH), którego poziom jest podwyższony w komórkach glejaka i w znacznej mierze odpowiada za oporność tych komórek na działanie czynników alkilujących stosowanych w terapii tych nowotworów.

Powyższe fakty spowodowały wzrost zainteresowania GA - zarówno regulacją ekspresji kodujących ją genów, jak i rolę, jaką mogą w komórce pełnić jej poszczególne izoformy. GA jest kodowana w komórkach ssaków przez dwa geny: *Gls* i *Gls2*, a rozregulowana ekspresja i/lub aktywność poszczególnych izoform GA jest cechą charakterystyczną komórek linii nowotworowych i nowotworów o różnej histogenezie. Warto zaznaczyć, że izoforma kodowana przez gen *GLS2* może być zlokalizowana w jądrach komórkowych neuronów, co w zestawieniu ze specyficzną strukturą tego białka sugeruje, że poza funkcją enzymatyczną może ono pełnić w komórce także inne funkcje, na przykład pośrednio lub bezpośrednio regulować proces transkrypcji.

Punktem wyjścia do prowadzonych przez nas obecnie badań stała się obserwacja silnej ekspresji genu *GLS* przy jednoczesnym śladowym poziomie ekspresji genu *GLS2* w komórkach glioblastoma. Wynik ten dobrze wpisuje się w coraz liczniejsze dane literaturowe wskazujące na to, że izoformy kodowane przez każdy z genów pełnią w komórkach nowotworowych przeciwstawne funkcje: gen *GLS* ulega wzmożonej ekspresji w komórkach intensywnie proliferujących, podczas gdy ekspresja genu *GLS2* jest charakterystyczna dla komórek o niskim poziomie proliferacji.

Celem naszych kolejnych badań było przetestowanie wpływu ektopowej ekspresji genu *GLS2* na fenotyp komórek glioblastoma. W badaniach prowadzonych we współpracy z Zakładem Biologii Molekularnej i Biochemii Uniwersytetu w Maladze wykazaliśmy, że transfekcja sekwencją kodującą izoformę *GLS2* powoduje obniżenie poziomu proliferacji i zdolności migracyjnych komórek glioblastoma, a także uwrażliwia te komórki na działanie czynników alkilujących stosowanych w terapii glioblastoma. Uwrażliwienie to jest skutkiem obniżenia w komórkach transfekowanych sekwencją *GLS2* poziomu ekspresji genu *MGMT* i aktywności kodowanego przez ten gen białka. Należy podkreślić, że transfekcja komórek glioblastoma sekwencją *GLS2* powoduje znacząco zmienia poziom ekspresji licznych genów, w tym co najmniej kilkunastu kodujących białka związane z procesem nowotworzenia. Powstaje oczywiście pytanie o dokładny mechanizm działania tej izoformy GA: czy jest ona bezpośrednio zaangażowana w regulację transkrypcji, czy może pośrednio poprzez oddziaływanie z innymi białkami lub poprzez modulację wewnątrzkomórkowego poziomu Gln, która również w pewnych modelach może wpływać na proces transkrypcji.

Ostatnio podjęta przez nas ścieżka badawcza dotyczy mechanizmów odpowiedzialnych za obniżenie ekspresji genu *GLS2* w komórkach glejaków. Dane literaturowe wskazują, że o ile ekspresja genu *GLS* jest indukowana przez onkogen c-Myc, to ekspresja genu *GLS2* regulowana jest poprzez białko supresorowe p53. Nasze badania wykazały jednak, że w komórkach linii glioblastoma - niezależnie od tego czy zawierają dziką, czy zmutowaną wersję białka p53 - gen *GLS2* podlega epigenetycznemu wyciszeniu na skutek metylacji promotora. W dalszych badaniach będziemy testować poziom metylacji promotora *GLS2* w materiale biopsyjnym pochodzącym od pacjentów z różnymi typami glejaków.

Prowadzone przez nas badania nie ograniczają się jednak do roli GLS2 w komórkach glejaków, równolegle badamy także udział izoform kodowanych przez gen *GLS* w kształtowaniu fenotypu tych nowotworów. Wyciszenie ekspresji genu *GLS* znacznie hamuje proliferację komórek linii glioblastoma. Wydaje się zatem, że związki blokujące ekspresję i/lub aktywność izoform kodowanych przez *GLS* mogą okazać się skutecznymi elementami terapii antyglejakowej. Testowane przez nas pochodne tiadiazoli syntetyzowane w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wykazują silne działanie antyglejakowe przy jednoczesnym braku działania toksycznego wobec prawidłowych astrocytów i neuronów. Bazując na danych literaturowych postawiliśmy hipotezę, że mechanizm działania tych związków polega właśnie na blokowaniu aktywności izoform GA kodowanych przez gen *GLS*. Sprawdzenie tej hipotezy jest jednym z aktualnie prowadzonych przez nas zadań badawczych. Wierzymy, że prowadzone badania pozwolą w przyszłości na zwiększenie skuteczności dotąd stosowanych, opartych o interwencję w całym wachlarz innych szlaków metabolicznych, prób hamowania rozwoju glejaka.