



Dr Monika Szeliga

# Glutamina w glejopochodnych komórkach nowotworowych

Monika Szeliga

Zakład Neurotoksykologii, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk, Warszawa

e-mail: mszeliga@imdik.pan.pl

## Wstęp

### Glutamina w ośrodkowym układzie nerwowym

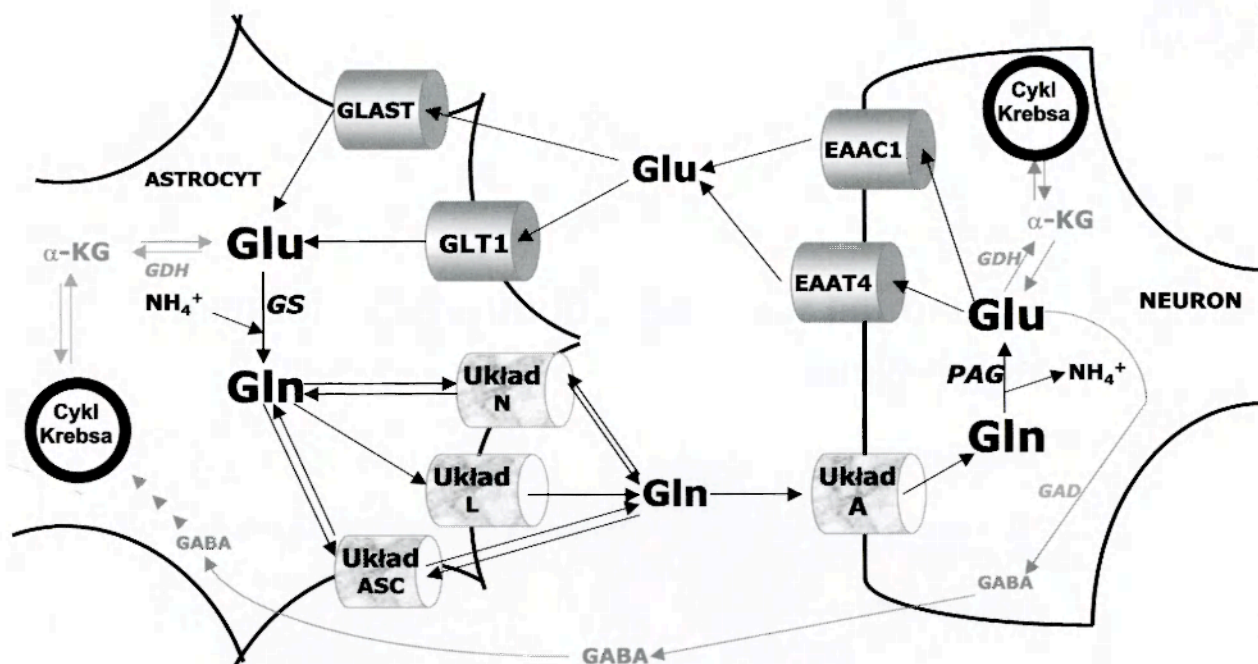
Glutamina (Gln) jest najbardziej rozpowszechnionym aminokwasem w organizmie [40]. W mózgu jej stężenie wynosi 6–11 mM [15]. Podobnie jak w innych tkankach, w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) Gln jest zaangażowana w przemiany energetyczne komórki: powstający z Gln glutaminian (Glu) ulega deaminacji do  $\alpha$ -ketoglutaranu, jednego z metabolitów pośrednich w cyklu Krebsa. Zagadnienia związane z udziałem Gln w procesach energetycznych przedstawione są w licznych pracach przeglądowych [1, 3, 7].

W OUN Gln zaangażowana jest także w procesy swoiste dla tego układu: metabolizm amoniaku i syntezę neuroprzekazników: pobudzającego glutaminianu (Glu) i hamującego kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA). Gln syntetyzowana jest z Glu i amoniaku w astrocytach, w których zlokalizowana jest syntetaza glutaminy (GS, EC 6.3.1.2) [27]. Gln jest uwalniana z astrocytów, a następnie transportowana do zakończeń nerwowych [50]. W transporcie Gln pomiędzy astrocytami i neuronami bierze udział szereg transporterów błonowych należących do układów A, ASC, N, L [3]. W neuronach Gln ulega hydrolizie do Glu pod wpływem aktywowanej fosforanem glutaminazy

(PAG, EC 3.5.1.2), występującej zarówno w neuronach, jak i astrocytach [33]. Reakcja dekarboksylacji Glu katalizowana przez dekarboksylazę glutaminianową (GAD, EC 4.1.1.15) prowadzi do powstania GABA [36]. Z kolei reakcja deaminacji Glu katalizowana przez dehydrogenazę glutaminianową (GDH, EC 1.4.1.2) prowadzi do powstania  $\alpha$ -ketoglutaranu, który jest włączany do cyklu Krebsa [6]. W transporcie Glu z neuronów do astrocytów biorą udział transportery: zlokalizowane głównie w neuronach EAAT3 (EAAC1) i EAAT4 oraz zlokalizowane głównie w astrocytach GLAST (EAAT1) i GLT-1 (EAAT2) [8]. W astrocytach Glu ulega metabolizmowi do Gln, co zamyka cykl Gln-Glu (Ryc. 1).

### Rola Gln w komórkach nowotworowych o różnej histogenezie

Już w latach 50-tych ubiegłego stulecia Eagle i wsp. wykazali, że komórki nowotworowe metabolizują znacznie większe ilości Gln, niż jakiegokolwiek innego aminokwasu [14]. Gln jest z jednej strony źródłem energii dla komórek nowotworowych, z drugiej zaś – prekursorem wielu związków biologicznie czynnych. Liczne dane literaturowe wskazują na bezpośredni związek między obecnością Gln w pożywce a intensywnością proliferacji komórek różnych linii nowotworowych [47, 51, 29], ich adhezyjnością [47]



**Ryc. 1.** Cykl glutamina (Glu) – glutaminian (Gln) w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). Gln syntetyzowana jest z Glu i jonów amonowych ( $\text{NH}_4^+$ ) w astrocytach w reakcji katalizowanej przez syntetazę glutaminy (GS). Po uwolnieniu z astrocytów Gln transportowana jest do neuronów. W transporcie pomiędzy astrocytami i neuronami biorą udział transportery należące do układów A, ASC, N i L. W neuronach Gln ulega hydrolizie do Glu pod wpływem aktywowanej fosforanem glutaminazy (PAG), występującej zarówno w neuronach, jak i astrocytach. Reakcja dekarboksylacji Glu katalizowana przez dekarboksylazę glutaminianową (GAD) prowadzi do powstania kwasu  $\gamma$ -aminomastowego (GABA). Reakcja deaminacji Glu katalizowana przez dehydrogenazę glutaminianową (GDH) prowadzi do powstania  $\alpha$ -ketoglutaranu włączanego do cyklu Krebsa. W transporcie Glu z neuronów do astrocytów biorą udział transportery: zlokalizowane głównie w neuronach EAAT3 (EAAC1) i EAAT4 oraz zlokalizowane głównie w astrocytach GLAST (EAAT1) i GLT-1 (EAAT2).

oraz poziomem syntezy DNA i białek [51, 41]. Ponadto powstający z Gln Glu jest prekursorem syntezy glutationu (GSH) – głównego antyoksydanta komórkowego, w dużej mierze odpowiedzialnego za oporność nowotworów na radioterapię i chemioterapię [26, 32].

Dokładne omówienie problematyki związanej z funkcjami Gln w komórkach nowotworowych o różnej histogenezie wykracza poza temat niniejszego artykułu. Obecny stan wiedzy na temat tych zagadnień jest doskonale przedstawiony w licznych pracach przeglądowych [9, 10, 34].

## Rola Gln w komórkach glejaka

Pierwsze obserwacje dotyczące istotnej roli Glu w komórkach glejaka poczynili Dranoff i wsp. [13].

Dla komórek większości przebadanych linii glejaka ludzkiego Gln okazała się być czynnikiem limitującym proliferację. Zahamowanie procesu proliferacji przy braku Gln w pożywce jest zapewne konsekwencją obserwowanego w tych komórkach braku ekspresji GS, której aktywność jest niezbędna do syntezy Gln. Podobne obserwacje dotyczą szczurzych komórek glejaka C6, które również nie są w stanie dzielić się w pożywce pozbawionej Gln [25].

Brak Gln w pożywce wpływa na fenotyp komórek C6: ich kształt zmienia się z owalnego na wrzecionowaty [11, 25], a poziom ekspresji markera astrocytarnego GFAP znacznie wzrasta w stosunku do poziomu jego ekspresji w komórkach hodowanych w obecności Gln [11]. Ponadto komórki C6 hodowane bez Gln charakteryzują się niską zawartością Gln, ale także Glu, GABA i alaniny, co najprawdopodobniej jest konsekwencją zahamowanych procesów syntezy i metabolizmu Gln [11].

Przedstawiając liczne funkcje Gln w komórkach glejaka nie można pominąć roli tego aminokwasu w regulacji objętości komórki – zjawiska niezwykle istotnego dla procesu migracji. W przeciwieństwie do komórek nowotworów obwodowych, które pasywnie przemieszczają się z krwią lub limfą, komórki glejaka zmieniają kształt i objętość, co umożliwia im aktywne pokonywanie wąskich przestrzeni w mózgu [37, 38]. Gln jest aminokwasem zarówno niezbędnym, jak i wystarczającym do odzyskania przez komórki glejaka wyjściowej objętości [16].

### Transport Gln w komórkach glejaka

Intensywny metabolizm Gln w komórkach nowotworowych możliwy jest między innymi dzięki wzmoczonemu transportowi tego aminokwasu przez błonę komórkową. Nadekspresję transportera ASCT2, przedstawiciela systemu ASC, stwierdzono w różnych tkankach i liniach komórek nowotworowych [5, 20, 52, 53]. Także w szczurzych komórkach glejaka C6 gen *ASCT2* ulega silnej ekspresji [12], a badania funkcjonalne potwierdziły dominującą rolę systemu ASC w transporcie Gln w tych komórkach [11, 12]. Podobnie nadekspresję ASCT2 stwierdzono w ludzkich glejakach o III i IV stopniu złośliwości wg WHO, hodowlach pierwotnych wyprowadzonych z glejaków i przerzutach nowotworów narządów obwodowych do OUN [35]. Z tej ostatniej pracy pochodzi ciekawa obserwacja dotycząca ekspresji transporterów systemu N w guzach OUN: cechą swoistą dla glioblastoma jest nadekspresja transportera SNAT3, natomiast poziom ekspresji SNAT5 w tym materiale jest taki, jak w tkance kontrolnej. Poziom ekspresji SNAT1, przedstawiciela systemu A, również nie różni się między tkankami nowotworowymi i kontrolnymi [35].

### Glutaminazy w komórkach glejaka

Drugim (obok wzmoczonego transportu do komórki) elementem umożliwiającym intensywny metabolizm Gln jest wysoka aktywność PAG – stąd zjawiskiem często obserwowanym zarówno w komórkach linii nowotworowych, jak i nowotworach o różnej histogenezie jest podwyższona ekspresja i/lub aktywność poszczególnych izoform tego enzymu [43]. W komórkach ssaków zidentyfikowano dwa geny kodujące

PAG: gen *Gls* koduje glutaminazę typu nerkowego (*kidney-type glutaminase*, KGA) oraz izoformy GAC i GAM; gen *Gls2* koduje glutaminazę typu wątrobowego (*liver-type glutaminase*, LGA) oraz izoformę GAB. Izoformy powstające z tych genów różnią się między sobą strukturą, właściwościami kinetycznymi oraz tkankami, w których ulegają ekspresji [24]. Warto nadmienić, iż istnieją przesłanki sugerujące, że izoforma LGA może pełnić funkcje nie tylko enzymatyczne: z jednej strony udokumentowano jądrową lokalizację tego białka w mózgu szczura i małpy [28], z drugiej zaś strony analiza sekwencji LGA wykazała obecność motywów potencjalnie zaangażowanych w oddziaływanie z innymi białkami [23]. Znaczenie zaskakującej lokalizacji komórkowej LGA oraz motywów zidentyfikowanych w obrębie tego białka nie jest znane, jednak postuluje się bezpośredni bądź pośredni udział LGA w regulacji procesu transkrypcji [23].

Wyniki badań nad ekspresją i aktywnością glutaminaz w komórkach różnych typów nowotworów *in situ* i linii nowotworowych sugerują, że wysoki poziom ekspresji izoformy KGA jest charakterystyczny dla komórek silnie proliferujących, natomiast izoforma LGA ulega silnej ekspresji w zróżnicowanych komórkach nieulegających podziałom [31]. Warto podkreślić, że zablokowanie ekspresji lub aktywności izoform powstających z genu *Gls* hamuje proliferację komórek *in vitro* i ich potencjał do transformacji nowotworowej *in vivo* [21, 49].

W glioblastoma izoforma GAC ulega nadekspresji, natomiast LGA ekspresjonowana jest jedynie w śladowych ilościach [45]. Obniżony poziom ekspresji LGA wykazano także w guzach mózgu pochodzących z innych niż astrocyty komórek glejowych oraz w guzach pochodzenia neuronalno-glejowego, niezależnie od ich stopnia złośliwości [42]. W dalszych badaniach nad rolą LGA w glejakach wykorzystaliśmy komórki linii glejaka ludzkiego T98G o znacznie obniżonym poziomie ekspresji genu *Gls2*. Transfekcja tych komórek sekwencją kodującą LGA obniżyła potencjał proliferacyjny i zdolności migracyjne komórek [44]. Ponadto w komórkach transfekowanych sekwencją LGA (linia TLGA) zaobserwowaliśmy rozregulowaną w stosunku do komórek linii T98G ekspresję licznych genów, przy czym część z nich koduje białka potencjalnie zaangażowane w proces nowotworzenia.

Jednym z genów, których ekspresja jest obniżona w komórkach TLGA jest gen kodujący metylotrans-

ferazę O<sup>6</sup> metyloguaniny, MGMT (EC 2.1.1.63) – białko usuwające z DNA grupy alkilowe [30], wprowadzane do DNA m.in. na skutek działania związków alkilujących, często stosowanych w terapii glejaków. Wysoka ekspresja i aktywność MGMT jest jednym z czynników odpowiedzialnych za lekooporność tych nowotworów [19]. Ostatnie badania na komórkach T98G i TLGA wykazały, że obniżenie poziomu ekspresji MGMT w komórkach TLGA pociąga za sobą wzrost ich wrażliwości na działanie związków alkilujących.

## Rola Glu w komórkach glejaka

Powstający z Gln Glu jest głównym neurotransmiterem ekscytotoksycznym, który w zdrowej tkance po uwolnieniu z neuronów presynaptycznych jest usuwany do astrocytów przez sodozależne transportery [8]. Wychwyt Glu przez astrocyty zapobiega nadmiernej aktywacji receptorów NMDA, co chroni w ten sposób neurony przed śmiercią.

Zmienione nowotworowo astrocyty nie są w stanie chronić neuronów przed działaniem Glu gromadzącego się w dużym stężeniu w przestrzeni międzykomórkowej. Zarówno komórki linii ludzkiego glejaka, jak i komórki z hodowli pierwotnych wyprowadzonych z glioblastoma pobierają znacznie mniejsze ilości Glu niż astrocyty z hodowli pierwotnych. Jednocześnie komórki linii glejaka uwalniają dużą pulę tego aminokwasu, podczas gdy astrocyty z hodowli pierwotnych intensywnie usuwają go z pożywki [55].

Zjawisko intensywnego wyrzutu Glu przez komórki glejaka zaobserwowano także w układach *in vivo* [4, 46]. Również analiza mikrodializatów tkanek nowotworowych pobranych od pacjentów z glioblastoma wykazała kilkukrotnie podwyższony poziom Glu w porównaniu z mikrodializatami tkanek kontrolnych [22].

Uwalniany w dużych ilościach Glu ma ogromne znaczenie dla wzrostu guza i migracji komórek. Należy podkreślić, że ze względu na specyficzną lokalizację nowotwory OUN mają przestrzeń do wzrostu ograniczoną kośćmi czaszki lub kanału kręgowego. Długotrwały wzrost guza wymaga przestrzeni powstającej kosztem destrukcji zdrowej tkanki, następującej pod wpływem neurotoksycznego działania Glu. Teorię tę zbudowano na podstawie

wyników uzyskanych w efekcie prowadzenia kokultury neuronów i komórek glejaka: liczba żywych neuronów w takiej kokulturze znacząco spada zarówno wtedy, kiedy neurony mają bezpośredni kontakt z komórkami nowotworowymi, jak i w przypadku zastosowania przestrzennego rozdziału obu typów komórek. Istotną obserwacją jest spadek poziomu neurotoksyczności Glu wraz ze wzrostem odległości od komórek glejaka: im większy dystans dzieli neurony od komórek glejaka, tym więcej ich przeżywa. Neurotoksyczne działanie Glu może być zablokowane w znacznej mierze przez antagonistów receptora NMDA (MK-801 i D-AP5) i w mniejszym stopniu przez antagonistę receptora AMPA (CNQX) [55].

Potwierdzeniem teorii, że uwalniany przez komórki glejaka Glu ułatwia wzrost guza są wyniki badań *in vivo*. Wszczepienie szczurom komórek dzikiej linii glejaka C6 wydzielających Glu powoduje wzrost guza i prowadzi do śmierci zwierząt w czasie krótszym niż 50 dni. Implantacja komórek wydzielających zwiększoną ilość Glu przyspiesza wzrost guza i śmierć zwierząt, natomiast wszczepienie komórek wydzielających śladowe ilości Glu nie wpływa na przeżywalność zwierząt, a nowotwory formowane przez te komórki są znikome [46].

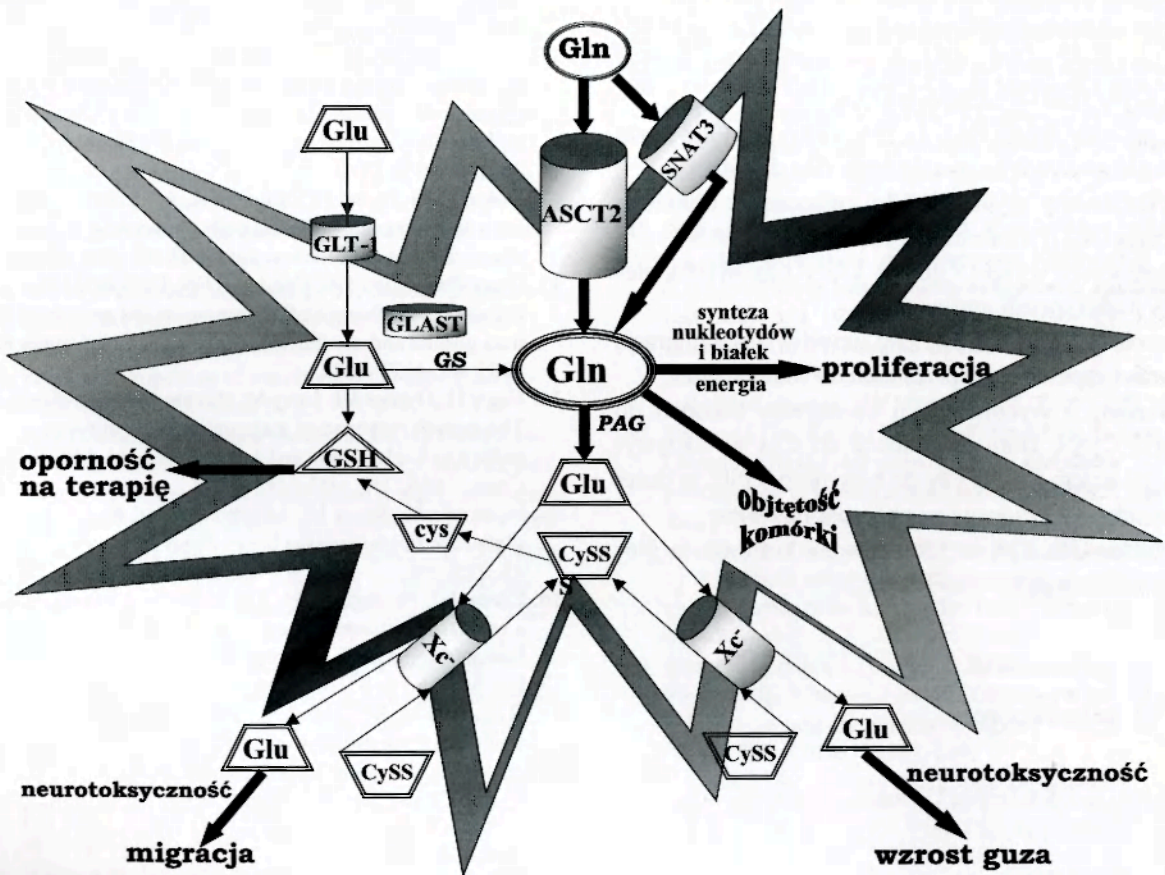
## Zaburzony transport Glu w komórkach glejaka

Przedstawione powyżej zjawisko gromadzenia się dużych ilości Glu jest spowodowane upośledzonym transportem tego aminokwasu w komórkach glejaka. Zmniejszony wychwyt Glu przez komórki glejaka wynika z zaburzonej ekspresji i nieprawidłowej lokalizacji komórkowej GLT-1 i GLAST – białek transportujących ten aminokwas do zdrowych astrocytów. W porównaniu do szczurzych astrocytów komórki linii glejaka ludzkiego charakteryzują się obniżoną ekspresją transportera GLT-1. Poziom ekspresji GLAST jest zbliżony w astrocytach i komórkach linii glejaka, jednakże w przypadku astrocytów transporter ten zlokalizowany jest przede wszystkim na powierzchni komórek, natomiast w komórkach glejaka – w jądrach komórkowych. Śladowe ilości lub brak GLT-1 i jądrową lokalizację GLAST stwierdzono także w materiale biopsyjnym pochodzącym od pacjentów z glioblastoma [54].

Za zwiększony wyrzut Glu odpowiada przede wszystkim antyporter cystynowo-glutaminianowy należący do układu  $x_c^-$ , który transportuje do wnętrza komórki cystynę (CySS), a na zewnątrz komórki – Glu [54]. L-cystyna stymuluje wypływ Glu, a obecność Gln w pożywce dodatkowo wzmacnia ten wypływ. Farmakologiczne zablokowanie wymiennika  $x_c^-$  analogiem Glu, S-4CPG, hamuje wypływ Glu i niweluje neurotoksyczne działanie tego aminokwasu. W tej samej pracy wykazano także, że uwalniany Glu jest syntetyzowany w komórkach glejaka *de novo*. Warto dodać, że nadekspresję transportera  $x_c^-$  stwierdzono zarówno w komórkach linii glejaka, jak i w materiale biopsyjnym pochodzącym od pacjentów z glioblastoma [39].

## Glutation w komórkach glejaka

Zaangażowanie antyportera cystynowo-glutaminianowego  $x_c^-$  w wyrzut Glu z komórek glejaka wiąże się z intensywnym transportem CySS do wnętrza tych komórek. CySS jest prekursorem cysteiny (Cys), kluczowego substratu w biosynthese glutationu (GSH) – tripeptydu syntetyzowanego z Glu, Cys (zredukowanej formy CySS) i glicyny (Gly) [18]. Transport CySS do komórki jest czynnikiem limitującym produkcję GSH. Poziom GSH – jednego z podstawowych antyoksydantów komórkowych – jest podwyższony w komórkach linii glejaka i w znacznej mierze odpowiada za oporność tych komórek na działanie



**Ryc. 2.** Rola glutaminy (Gln) i jej metabolitów w komórkach glejaka. Gln biorąc udział w przemianach energetycznych oraz syntezie nukleotydów i białek odgrywa ważną rolę w proliferacji komórek; zaangażowana jest także w regulację objętości komórki, zjawisko istotne w procesie migracji. Nadekspresja transporterów ASCT2 i SNAT3 odpowiada za wzmożony transport Gln do komórek glejaka. Intensywny metabolizm Gln jest możliwy dzięki nadekspresji glutaminazy aktywowanej fosforanem (PAG) i prowadzi do powstania glutaminianu (Glu) usuwanego z komórek poprzez antyporter  $x_c^-$ . Uwalniany w dużych ilościach Glu działa neurotoksycznie zapewniając przestrzeń do wzrostu guza i umożliwiając migrację komórek. Z intensywnym wyrzutem Glu związany jest wzmożony transport cystyni (CySS) do wnętrza komórki. CySS ulega redukcji do cysteiny (Cys), która wraz z Glu wykorzystywana jest do biosynthese glutationu (GSH), w dużej mierze odpowiedzialnego za oporność guzów na terapię.

stresu oksydacyjnego i czynników alkilujących stosowanych w terapii tych nowotworów [2, 17]. Także oporność glejaków na radioterapię wydaje się być związana z wysokim poziomem GSH w tych guzach [48].

## Podsumowanie

W komórkach glejaka wykazano:

1. istotną rolę Gln w procesie proliferacji (udział w przemianach energetycznych oraz syntezie nukleotydów i białek), a także regulacji objętości komórki, zjawiska ważnego w procesie migracji,
2. wzmożony transport Gln, za który odpowiada ulegający nadekspresji transporter ASCT2; SNAT3 również ulega nadekspresji, odgrywa jednak znacznie mniejszy udział w transporcie Gln,
3. wysoką ekspresję PAG (jej izoformy GAC) z czym wiąże się intensywny metabolizm Gln do Glu,
4. zahamowany wychwyt Glu związany z obniżoną ekspresją GLT-1 i zaburzoną lokalizacją GLAST,
5. intensywny wyrzut Glu, za który odpowiada ulegający nadekspresji antyporter  $x_c^-$ ,
6. neurotoksyczne działanie Glu umożliwiające migrację komórek i zapewniające przestrzeń do wzrostu guza,
7. związany z wyrzutem Glu intensywny transport do komórki CySS, która po redukcji do Cys wykorzystywana jest razem z Glu i Gly do biosyntezy GSH, w dużej mierze odpowiedzialnego za oporność na terapię.

Funkcje Gln i jej metabolitów w komórkach glejaka przedstawione są na Ryc. 2.

## Piśmiennictwo:

1. Albrecht J, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe A: Glutamine in the central nervous system: function and dysfunction. *Front Biosci*, 2007, 12, 332–343.
2. Ali-Osman F, Stein DE, Renwick A: Glutathione content and glutathione-S<sup>-</sup>-transferase expression in 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea-resistant human malignant astrocytoma cell lines. *Cancer Res*, 1990, 50, 6976–6980.
3. Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS: The glutamate/GABA/glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem*, 2006, 98, 641–653.
4. Behrens PF, Langemann H, Strohschein R, Draeger J, Hennig J: Extracellular glutamate and other metabolites in and around RG2 rat glioma: an intracerebral microdialysis study. *J Neurooncol*, 2000, 47, 11–22.
5. Bode BP, Fuchs BC, Hurley BP, Conroy JL, Suetterlin JE, Tanabe KK, Rhoads DB i wsp.: Molecular and functional analysis of glutamine uptake in human hepatoma and liver-derived cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002, 283, F062–G1073.
6. Colon AD, Plaitakis A, Perakis A, Berl S, Clarke DD: Purification and characterization of a soluble and a particulate glutamate dehydrogenase from rat brain. *J Neurochem*, 1986, 46, 1811–1819.
7. Daikhin Y, Yudkoff M: Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *J Nutr* 2000, 130, 1026S–1031S.
8. Danbolt NC: Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*, 2001, 65, 1–105.
9. Daye D, Wellen KE: Metabolic reprogramming in cancer: Unraveling the role of glutamine in tumorigenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 2012, [Epub ahead of print].
10. DeBerardinis RJ, Cheng T: Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene*, 2010, 29, 313–324.
11. Dolinska M, Dybel A, Hilgier W, Zielinska M, Zabłocka B, Buzanska L, Albrecht J: Glutamine transport in C6 glioma cells: substrate specificity and modulation in a glutamine deprived culture medium. *J Neurosci Res*, 2001, 66, 959–966.
12. Dolinska M, Dybel A, Zabłocka B, Albrecht J: Glutamine transport in C6 glioma cells shows ASCT2 system characteristics. *Neurochem Int*, 2003, 43, 501–507.
13. Dranoff G, Elion GB, Friedman HS, Campbell GL, Bigner DD: Influence of glutamine on the growth of human glioma and medulloblastoma in culture. *Cancer Res*, 1985, 45, 4077–4081.
14. Eagle H, Oyama VI, Levy M, Horton CL, Fleischman R: The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid. *J Biol Chem*, 1956, 218, 607–616.
15. Erecinska M, Silver IA: Metabolism and the role of glutamate in mammalian brain. *Progr Neurobiol* 1990, 35, 245–296.
16. Ernest NJ, Sontheimer H: Extracellular glutamine is a critical modulator for regulatory volume increase in human glioma cells. *Brain Res*, 2007, 1144, 231–238.
17. Iida M, Sunaga S, Hirota N, Kuribayashi N, Sakagami H, Takeda M, Matsumoto K: Effect of glutathione-modulating compounds on hydrogen-peroxide-induced cytotoxicity in human glioblastoma and glioma cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1997, 123, 619–622.
18. Jefferies H, Coster J, Khalil A, Bot J, McCauley RD, Hall JC: Glutathione. *ANZ J Surg* 2003, 73, 517–522.
19. Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP: MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)*, 2007, 6, 1079–1099.
20. Li R, Younes M, Frolov A, Wheeler TM, Scardino P, Ohori M, Ayala G: Expression of neutral amino acid transporter ASCT2 in human prostate. *Anicancer Res*, 2003, 23, 3414–3418.
21. Lobo C, Ruiz-Bellido MA, Aledo JC, Márquez J, Núñez De Castro I, Alonso FJ: Inhibition of glutaminase

- expression by antisense mRNA decreases growth and tumorigenicity of tumour cells. *Biochem J*, 2000, 348, 257–261.
22. Marcus HJ, Carpenter KL, Price SJ, Hutchinson PJ: In vivo assessment of high-grade glioma biochemistry using microdialysis: a study of energy-related molecules, growth factors and cytokines. *J Neurooncol*, 2010, 97, 11–23.
  23. Marquez J, de la Oliva AR, Mates JM, Segura JA, Alonso FJ: Glutaminase: a multifaceted protein not only involved in generating glutamate. *Neurochem Int*, 2006, 48, 465–471.
  24. Marquez J, Tosina M, de la Rosa V, Segura JA, Alonso FJ, Matés JM, Campos-Sandoval JA: New insights into brain glutaminases: beyond their role on glutamatergic transmission. *Neurochem Int*, 2009, 55, 64–70.
  25. Martin M, Beauvoit B, Voisin PJ, Canioni P, Guérin B, Rigoulet M: Energetic and morphological plasticity of C6 glioma cells grown on 3-D support; effect of transient glutamine deprivation. *J Bioenerg Biomembr*, 1998, 30, 565–578.
  26. Miura M, Sasaki T: Role of glutathione in the intrinsic radioresistance of cell lines from a mouse squamous cell carcinoma. *Radiat Res*, 1991, 126, 229–236.
  27. Norenberg MD: Distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. *J Histochem Cytochem*, 1979, 27, 756–762.
  28. Olalla L, Gutierrez A, Campos JA, Khan ZU, Alonso FJ, Segura JA, Márquez J, Aledo JC: Nuclear localization of L-type glutaminase in mammalian brain. *J Biol Chem*, 2002, 277, 38939–38944.
  29. Pawlik TM, Souba W, Sweeney TJ, Bode BP: Amino acid uptake and regulation in multicellular hepatoma spheroids. *J Surg Res*, 2000, 91, 15–25.
  30. Pegg AE: Properties of mammalian O6-alkylguanine-DNA transferases. *Mutat Res*, 1990, 233, 165–175.
  31. Pérez-Gómez C, Campos-Sandoval JA, Alonso FJ, Segura JA, Manzanares E, Ruiz-Sánchez P, González ME i wsp.: Co-expression of glutaminase K and L isoenzymes in human tumour cells. *Biochem J*, 2005, 386, 535–542.
  32. Rouse K, Nwokedi E, Woodliff JE, Epstein J, Klimberg VS: Glutamine enhances selectivity of chemotherapy through changes in glutathione metabolism. *Ann Surg*, 1995, 221, 420–426.
  33. Schousboe A, Hertz L, Svenneby G, Kvamme E: Phosphate activated glutaminase activity and glutamine uptake in primary cultures of astrocytes. *J Neurochem* 1979, 32, 943–950.
  34. Shanware NP, Mullen AR, DeBerardinis RJ, Abraham RT: Glutamine: pleiotropic roles in tumor growth and stress resistance. *J Mol Med*, 2011, 89, 229–236.
  35. Sidoryk M, Matyja E, Dybel A, Zielinska M, Bogucki J, Jaskólski DJ, Liberski PP, Kowalczyk P, Albrecht J: Increased expression of a glutamine transporter is a marker of malignant gliomas. *NeuroReport*, 2004, 15, 575–579.
  36. Sonnewald U, Westergaard N, Schousboe A, Svendes JS, Unsgard G, Petersen SB: Direct demonstration by [<sup>13</sup>C] NMR spectroscopy that glutamine from astrocytes is a precursor for GABA synthesis in neurons. *Neurochem Int* 1993, 22, 19–29.
  37. Sontheimer H: Malignant gliomas: preventing glutamate and ion homeostasis for selective advantage. *TRENDS in Neurosci*, 2003, 26, 543–549.
  38. Sontheimer H: Ion channels and amino acid transporters support the growth and invasion of primary brain tumors. *Mol Neurobiol*, 2004, 29, 61–71.
  39. Sontheimer H: A role for glutamate in growth and invasion of primary brain tumors. *J Neurochem*, 2008, 105, 287–295.
  40. Souba WW: Glutamine and cancer. *Ann Surg*, 1993, 218, 715–728.
  41. Spittler A, Oehler R, Goetzinger P, Holzer S, Reissner CM, Leutmezer F, Rath V i wsp.: Low glutamine concentrations induce phenotypical and functional differentiation of U937 myelomonocytic cells. *J Nutr*, 1997, 127, 2151–2157.
  42. Szeliga M, Matyja E, Obara M, Grajkowska W, Czernicki T, Albrecht J: Relative expression of mRNAs coding for glutaminase isoforms in CNS tissues and CNS tumors. *Neurochem Res*, 2008, 33, 808–813.
  43. Szeliga M, Obara-Michlewska M: Glutamine in neoplastic cells: focus on the expression and roles of glutaminases. *Neurochem Int*, 2009, 55, 71–75.
  44. Szeliga M, Obara-Michlewska M, Matyja E, Lazarczyk M, Lobo C, Hilgier W, Alonso FJ i wsp.: Transfection with liver-type glutaminase cDNA alters gene expression and reduces survival, migration and proliferation of T98G glioma cells. *Glia*, 2009, 57, 1014–1023.
  45. Szeliga M, Sidoryk M, Matyja E, Kowalczyk P, Albrecht J: Lack of expression of the liver-type glutaminase (LGA) mRNA in human malignant gliomas. *Neurosci Lett*, 2005, 374, 171–173.
  46. Takano T, Lin JH, Arcuino G, Gao Q, Yang J, Nedergaard M: Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nat Med*, 2001, 7, 1010–1015.
  47. Turowski GA, Rashid Z, Hong F, Madri JA, Basson MD: Glutamine modulates phenotype and stimulates proliferation in human colon cancer cell lines. *Cancer Res*, 1994, 54, 5974–5980.
  48. Varshney R, Dwarakanath B, Jain V: Radiosensitization by 6-aminonicotinamide and 2-deoxy-D-glucose in human cancer cells. *Int J Radiat Biol*, 2005, 81, 397–408.
  49. Wang JB, Erickson JW, Fuji R, Ramachandran S, Gao P, Dinavahi R, Wilson KF i wsp.: Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Cell*, 2010, 18, 207–219.
  50. Waniewski RA, Martin DL: Exogenous glutamate is metabolized to glutamine and exported by rat primary astrocyte cultures. *J Neurochem*, 1986, 47, 304–313.
  51. Wasa M, Bode BP, Abcouwer SF, Collins CL, Tanabe KK, Souba WW: Glutamine as a regulator of DNA and protein biosynthesis in human solid tumor cell lines. *Ann Surg*, 1996, 224, 189–197.
  52. Wasa M, Wang HS, Okada A: Characterization of L-glutamine transport by a human neuroblastoma cell line. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, 282, C1246–C1253.
  53. Witte D, Ali N, Carlson N, Younes M: Overexpression of the neural amino acid transporter ASCT2 in human colo-



---

rectal adenocarcinoma. *Anticancer Res*, 2002, 22, 2555–2557.

54. Ye ZC, Rothstein JD, Sontheimer H: Compromised glutamate transport in human glioma cells: reduction-mislocalization of sodium-dependent glutamate trans-

porters and enhanced activity of cystine-glutamate exchange. *J Neurosci*, 1999, 19, 10767–10777.

55. Ye ZC, Sontheimer H: Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. *Cancer Res*, 1999, 59, 4383–4391.

