

Streszczenie

Przedmiotem badań stanowiących treść niniejszej rozprawy było poszukiwanie czynników prowadzących do hamowania proliferacji i indukcji apoptozy oraz mechanizmów regulacji tych procesów, w komórkach glejaka wielopostaciowego mózgu (*glioblastoma multiforme*, GBM). Jest to szczególnie złośliwa postać guza mózgu, powstająca w wyniku wielostopniowej transformacji komórek somatycznych, której towarzyszy akumulacja wielu zaburzeń genetycznych. Według najnowszych badań, obok zmian genetycznych w proces patogenezy GBM zaangażowane są także modyfikacje epigenomu związane z acetylacją/deacetylacją białek histonowych.

Enzymami odpowiedzialnymi za odwracalną acetylację/deacetylację histonów są odpowiednio: acetylotransferazy histonów (HATs) oraz deacetylazy histonów (HDACs). Inhibitory HDACs stanowią nową grupę potencjalnych czynników cytostatycznych, których działanie polega na hamowaniu deacetylacji histonów, co prowadzi do zmian w ekspresji genów. Do grupy inhibitorów HDACs należą między innymi kwas 4-fenylomasłowy (PBA) i belinostat (Bel), których aktywność przeciwnowotworowa udowodniona została w badaniach *in vitro*. Z uwagi na fakt, że glejak wielopostaciowy mózgu należy do nowotworów dla których dotychczas nie opracowano efektywnych metod leczenia, postanowiono ocenić wybrane komórkowe i molekularne efekty działania PBA i Bel na komórki glejaka mózgu linii LN-18 i LN-229.

Z przeprowadzonych badań wynika, iż zarówno PBA jak i Bel skutecznie hamują aktywność enzymatyczną deacetylaz histonów w komórkach glejaka mózgu linii LN-18 i LN-229. PBA obniża przeżywalność komórek linii LN-229, nie wykazując niemal żadnych właściwości cytotoksycznych wobec linii LN-18. Komórki linii LN-229 poddane działaniu tego kwasu podlegają silnemu hamowaniu cyklu komórkowego w fazie S i G2/M. Efektowi temu towarzyszy nasilenie ekspresji genu *p21* i obniżenie ekspresji genów białek antyapoptotycznych: *Bcl-2* i *Bcl-X_L*.

Bel hamuje proliferację obu badanych linii glejaka mózgu. Głównym mechanizmem cytostatycznym w komórkach traktowanych belinostatem jest indukcja apoptozy, która przebiega z ponad 2-krotnie większym nasileniem w komórkach linii LN-229 w porównaniu z LN-18. W niniejszej pracy wykazano, że w komórkach linii LN-229 pod wpływem belinostatu występuje wyraźny wzrost ekspresji *p21* oraz genów białek proapoptotycznych *Puma*, *Bim* i *Chop*, czemu towarzyszy obniżenie ekspresji białek opiekuńczych: GRP78 i

GRP94. Mechanizm nasilonej apoptozy w komórkach glejaka mózgu linii LN-229, traktowanych Bel, w stosunku do komórek linii LN-18, wynika z podwyższonej ekspresji czynników proapoptotycznych oraz obniżenia ekspresji cytoprotekcyjnych białek opiekuńczych (GRP78 i GRP94).

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że PBA jak i Bel skutecznie hamują aktywność enzymatyczną deacetylaz histonów w komórkach glejaka mózgu linii LN-18 i LN-229. PBA obniża przeżywalność komórek linii LN-229 a Bel hamuje proliferację w obu badanych liniach glejaka mózgu i kieruje komórki na drogę śmierci apoptotycznej. Można zatem wnioskować, że stosowanie obu inhibitorów, a szczególnie Bel, może stanowić potencjalny kierunek w rozwoju nowych strategii leczenia glejaków mózgu opartych o substancje o charakterze modulatorów epigenetycznych.

Summary

The purpose of these studies was to find factors inhibiting proliferation and inducing apoptosis in glioblastoma multiforme (GBM) cells, and subsequent identification of the molecular mechanisms underlying these effects. GBM is considered one of the most abundant type of glial tumors with poor prognosis of survival. GBM develops in a multistep process of somatic cell transformation followed by accumulation of genetic alterations. Recent findings confirm that GBM pathogenesis is also regulated on epigenetic level, and might be controlled by the process of histone acetylation and deacetylation.

The two crucial groups of counterworking enzymes responsible for guarding histone acetylation status are histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs). HATs regulate histone acetylation, while HDACs catalyze the process of histone deacetylation. HDACs inhibitors (HDACIs) are thought to be a novel group of the cytostatic agents increasing histone acetylation level and regulating gene expression. Belinostat (Bel) and 4-phenylbutyrate (PBA) are the members of a group of pan-HDACIs demonstrating antineoplastic activity in various models of malignancies. Considering the fact, that there is still no effective therapies against glioblastoma, new approaches aiming at inhibiting cancer cell growth, remain an area of active research. In this respect, molecular and cellular effects of PBA and Bel on LN-229 and LN-18 glioblastoma cell lines were examined.

According to the studies, both PBA and Bel, are able inhibit enzymatic activity of HDACs in LN-229 as well as LN-18 cell line. We observed that LN-18 cells seemed to be PBA-resistant, while PBA-treated LN-229 cells showed S- and G2/M-dependent cells cycle arrest. This effect was followed by up-regulation of *p21* and down-regulation of *Bcl-2/Bcl-X_L* transcripts.

In case of the cells exposed to Bel treatment, apoptosis was found to be the main mechanism responsible for causing cytostatic effect. Interestingly, in LN-229 cells apoptosis was induced over twice as strongly as in LN-18 cells. We further demonstrated that Bel-stimulated LN-229 cells showed up-regulation of the pro-apoptotic *Puma*, *Bim*, *Chop* and *p21* and marked decrease in expression of chaperone proteins GRP78 and GRP94. In LN-18 cells only *p21* transcript was significantly up-regulated. These discrepancies in gene and protein expressions may explain enhanced apoptotic cell death in LN-229 cells in comparison to LN-18 cells.

Altogether, our findings demonstrate that PBA and Bel may suppress HDACs enzymatic activity in both LN-229 and LN-18 cells. PBA reduces viability of LN-229 cells, while Bel inhibits proliferation of both investigated cell lines causing apoptotic cell death. This further suggests, that it seems to be a reasonable approach to test both HDACIs, especially Bel, as a potential cytostatic agents in epigenetic-based therapy for glioblastoma.