

СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ ГЛИОБЛАСТОМЫ К ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ ПУТЁМ ДЕПРИВАЦИИ ГЛУТАМИНА ЗАВИСИТ ОТ КЛЕТОЧНОГО ФЕНОТИПА И МЕТАБОЛИЗМА

© 2024 А.А. Исакова^{1,2}, И.Н. Дружкова³, А.М. Можеров³, Д.В. Мазур¹, Н.В. Антипова¹, К.С. Краснов⁴, Р.С. Фадеев⁴, М.Э. Гаспарян¹, А.В. Яголович^{2*}

¹ Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная почта: anneyagolovich@gmail.com

³ Приволжский исследовательский медицинский университет, 603081 Нижний Новгород, Россия

⁴ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290 Пущино, Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 03.06.2024

После доработки 23.08.2024

Принята к публикации 05.09.2024

Содержание глутамина играет важную роль в опухолевом метаболизме. Известно, что в толще солидных опухолей происходит депривация глутамина, которая влияет на рост и распространение опухоли. В работе было исследовано влияние депривации глутамина на клеточный метаболизм и чувствительность клеток глиобластомы человека U87MG и T98G к препаратам различной природы: алкилирующему цитостатику темозоломиду; цитокину TRAIL DR5-B – агонисту рецептора смерти 5 (DR5); а также GMX1778 – таргетному ингибитору фермента никотинамидфосфорибозилтрансферазы (NAMPT), лимитирующего биосинтез NAD. Биоинформатический анализ транскриптома показал, что клетки U87MG обладают более дифференцированным фенотипом относительно T98G, а также отличаются по профилю экспрессии генов, ассоциированных с метаболизмом глутамина. При депривации глутамина скорость роста клеток U87MG и T98G снижалась. Исходя из анализа клеточного метаболизма методом флуоресцентной время-разрешённой микроскопии (FLIM) NADH и оценки содержания лактата в среде, депривация глутамина смещала метаболический статус клеток U87MG в сторону гликолиза. Это сопровождалось повышением экспрессии маркера стволовости CD133 (проминина-1), что совокупно может свидетельствовать о дедифференцировке этих клеток. При этом повышались экспрессия рецептора DR5 и чувствительность клеток U87MG к DR5-B. Однако в клетках T98G депривация глутамина, наоборот, индуцировала сдвиг метаболизма в сторону окислительного фосфорилирования, снижение экспрессии DR5 и устойчивость к DR5-B. Эффекты ингибирования NAMPT также отличались в разных линиях и были противоположны эффектам DR5-B: при депривации глутамина клетки U87MG становились более резистентными, а T98G – более чувствительными к GMX1778. Таким образом, фенотипические и метаболические отличия между двумя клеточными линиями глиобластомы человека послужили причиной разнонаправленных метаболических изменений и контрастных ответов на воздействия различными таргетными препаратами при депривации глутамина. Эти данные следует учитывать при разработке стратегий лечения глиобластомы путём лекарственной депривации аминокислот, а также при исследовании новых потенциальных терапевтических мишеней.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: депривация глутамина, глиобластома, дифференцировка, CD133, TRAIL, DR5, NADH, FLIM-микроскопия, NAMPT, GMX1778.

DOI: 10.31857/S0320972524100043 EDN: IPVWAR

Принятые сокращения: CD133 – проминин-1; DR5 – рецептор смерти 5; FLIM – флуоресцентная время-разрешённая микроскопия; GSEA – Gene Sets Enrichment Analysis, анализ обогащения групп генов по функциональной принадлежности; NAMPT – никотинамидфосфорибозилтрансфераза; TRAIL – лиганд, вызывающий апоптоз, из семейства цитокинов фактора некроза опухоли; OXPHOS – окислительное фосфорилирование.

* Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

Для опухолевых клеток характерны интенсивные метаболические процессы, которые требуют повышенного расходования питательных веществ. Глутамин является наиболее распространённой заменимой аминокислотой в организме [1]. Высокое потребление глутамина опухолевыми клетками является адаптивным метаболическим механизмом, который способствует пролиферации в условиях гипоксии и дефицита питательных веществ. В процессе глутаминализа глутамин конвертируется в глутамат и α -кетоглутарат. Глутамин является донором углерода и азота для синтеза восстановленного глутатиона (GSH), таким образом регулируя окислительно-восстановительный статус опухолевых клеток [2]. Показано, что глутамин является анаплеротическим предшественником для цикла трикарбоновых кислот; кроме того, продуктом глутаминализа является NAD(P)H, который обеспечивает другие анаболические процессы [3]. Отсутствие глутамина может влиять на рост опухоли: к примеру, депривация глутамина в клетках остеосаркомы вызывала увеличение секреции провоспалительного хемокина интерлейкина-8 (IL-8) [4]; также недостаток глутамина способствовал с-MYC-опосредованному клеточному апоптозу [5]. Метаболизм глутамина может перепрограммироваться онкогенами с-MYC, KRAS, PI3K/AKT/mTOR, а также опухолевым супрессором p53 [2].

В солидных опухолях существует пространственная неоднородность в распределении кислорода и питательных веществ, которая приводит к локальной гипоксии. Подобно этому в опухолях существует и локальный дефицит глутамина, который может служить одним из факторов устойчивости к химиотерапии [6]. Среди солидных опухолей глиобластома особенно зависит от метаболизма глутамина, поскольку для нормальной функции мозга необходим гомеостаз нейротрансмиттера глутамата, источником которого является глутамин. При глиобластоме также была показана локальная депривация глутамина, которая была более выражена в глубине опухоли [7, 8]. Лекарственная терапия глиобластомы в настоящее время ограничивается преимущественно темозоломидом, цитостатическим химиопрепаратом алкилирующего типа. Однако ввиду его недостаточной эффективности необходим поиск новых перспективных молекулярных мишеней [9]. Известно, что рецептор смерти 5 (DR5) является прогностическим маркером для пациентов с глиобластомой [10], а также исследуется применение агонистов DR5 в терапии глиобластомы [11]. Другой перспективной мишенью является никотинамидфосфорибозилтрансфераза

(NAMPT) – фермент, катализирующий синтез никотинамидмононуклеотида, который является лимитирующей стадией биосинтеза NAD. Ингибиторы NAMPT обладают потенциалом для лечения солидных опухолей, в том числе глиобластомы [12].

Разрабатывается ряд стратегий лекарственной депривации глутамина в сочетании с другими противоопухолевыми препаратами для повышения терапевтической эффективности [13, 14]. Целью данной работы было исследование влияния депривации глутамина на метаболизм клеток глиобластомы человека и чувствительность к терапевтическому воздействию препаратами разной природы: конвенциональным химиопрепаратом темозоломидом [15], агонистом рецептора DR5 – модифицированным цитокином TRAIL (лиганд, вызывающий апоптоз, из семейства цитокинов фактора некроза опухоли) DR5-B [16], а также низкомолекулярным таргетным ингибитором NAMPT GMX1778 [17].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. Клеточные линии глиобластомы U87MG и T98G были получены из Американской коллекции типовых клеточных культур (ATCC, США) и культивировались в питательной среде DMEM («ПанЭко», Россия, кат. № C420п), содержащей 4,5 г/л глюкозы и 110 мг/мл пирувата натрия, с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки («HyClone», США, кат. № K052/SV30 160.03), 2 mM L-глутамина («ПанЭко», кат. № Ф032), пенициллина (100 мкг/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл) («ПанЭко», кат. № A073п) при 37 °C и 5% CO₂. Для моделирования депривации глутамина клетки инкубировали в среде без L-глутамина в течение не менее 72 ч.

Секвенирование транскриптомов. Секвенирование РНК проводили в ООО «Геноаналитика» на приборе HiSeq1500 («Illumina», США) с генерацией не менее 40 млн коротких чтений длиной 150 нуклеотидов. С помощью программы STAR (версия 2.7.9a) исходные чтения картировались на геном GRCh38, после чего подсчитывалось количество чтений, картированных на отдельные гены (аннотация Ensembl, версия 99) с не более чем тремя несоответствиями. Секвенирование РНК каждой из групп проводили в двух экземплярах.

Анализ дифференциальной экспрессии генов. Дифференциальная экспрессия генов культуры клеток U87MG относительно T98G была посчитана с помощью пакета DEseq2 версии 1.28.1 [18] для языка программирования R версии 4.2.2. Анализ обогащения по функциональной принад-

Таблица 1. Праймеры, используемые для проведения ПЦР в реальном времени.

№	Название	Последовательность (5' → 3')
1	p21 ^{Waf1} (CDKN1A-F110) прямой	AGTCAGTTCSTTGTGGAGCC
	p21 ^{Waf1} (CDKN1A-R110) обратный	CATTAGCGCATCACAGTCGC
2	p27 ^{KIP1} (CDKN1B-F115) прямой	TGTTTCAGACGGTTCCCCAAA
	p27 ^{KIP1} (CDKN1B-R115) обратный	CCATTCCATGAAGTCAGCGAT
3	CD133 прямой	ACTCCCATAAAGCTGGACCC
	CD133 обратный	TCAATTTTGGATTTCATATGCCTT
4	DR5 прямой	TGGAACAACGGGGACAGAACG
	DR5 обратный	GCAGCGCAAGCAGAAAAGGAG
5	cFLIP прямой	GGCTCCCCCTGCATCACATC
	cFLIP обратный	CCGCAGTACACAGGCTCCAGA
6	18S прямой	GGCCCTGTAATTGGAATGAGTC
	18S обратный	CCAAGATCCAACCTACGAGCTT

лежности групп генов (GSEA, Gene Sets Enrichment Analysis) производился по базе данных молекулярных сигнатур MsigDB (Molecular Signature DataBase) [19] с использованием библиотеки для языка программирования Python версии 3.11.7, GSEApy версии 1.0.6 [20]. Для анализа использовался ранжированный список генов, отсортированный по уменьшению кратности изменения экспрессии, полученный при расчёте дифференциальной экспрессии генов (GSEA preranked). Для детального изучения изменения транскрипционной активности клеток был проведён GSEA с использованием наборов генов из курируемых баз данных GeneOntology (субколлекции: GO: Biological Processes GO:BP, GO: Cellular Components GO:CC и GO: Molecular Functions GO:MF) [21], Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [22], Reactome [23], WikiPathways (WP) [24], Protein Interaction Database (PID) [25], Transcription Factor Targets Legacy (TFT Legacy) [26]. Для оценки изменения транскрипционной активности генов, ассоциированных с метаболизмом глутамина, был получен список генов из набора генов базы данных Reactome Glutamate and Glutamine Metabolism, для которого использовались значения кратности изменения экспрессии (logFC). Для оценки достоверности изменения экспрессии генов с использованием DESeq2 использовался тест Вальда с поправкой на множественное тестирование Беньямини–Хохберга (FDR) [27]. Все данные представлены для результатов $FDR \leq 0,05$.

Количественная ПЦР с обратной транскрипцией. Выделение тотальной РНК проводили с

использованием реагента для выделения РНК ExtractRNA («Евроген», Россия). Концентрацию РНК определяли на спектрофотометре Nanodrop One C («Thermo Fisher Scientific», США). Суммарную РНК использовали в качестве матрицы для построения кДНК с помощью набора MMLV RT kit («Евроген»), по инструкции производителя. Амплификация проводилась в течение 5 мин при 10 °C, а затем по 25 мин при 37 °C и 42 °C соответственно, при 70 °C в течение 10 мин для инактивации фермента. ПЦР в реальном времени проводили на приборе LightCycler 96 («Roche», Австрия) с использованием реагента qPCRMix-HS SYBR («Евроген»), согласно инструкции производителя по следующей программе: 95 °C в течение 150 с, затем 45 циклов: 95 °C в течение 20 с, 60 °C в течение 20 с и 72 °C в течение 20 с. Сбор данных осуществлялся с помощью программного обеспечения LightCycler Software (версия 4.1). Отсутствие побочных продуктов ПЦР определяли по кривой плавления. Для каждой пары праймеров во всех образцах наблюдали одинаковые пики плавления ПЦР каждого образца в трёх повторях. Полученные значения C_t (cycle threshold) для каждого образца не превышали 35. В качестве внутреннего контрольного образца использовали ген рибосомальной 18S РНК. Относительные уровни экспрессии генов рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Визуализация и статистическая обработка данных проводилась с использованием программы GraphPad Prism 9.3.1 («GraphPad Software», США). Выборки клеток сравнивали между собой с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Праймеры для детекции экспрессии генов p21^{Waf1}, p27^{Kip1}, CD133 (проминина-1), DR5 и cFLIP приведены в табл. 1.

Флуоресцентная время-разрешённая микроскопия (FLIM). Микроскопию метаболического кофактора NADH с временным разрешением (fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM) проводили с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 880 («Carl Zeiss», Германия). В качестве источника возбуждения использовали фемтосекундный Ti:Sa-лазер («Spectra Physics», США) с частотой следования импульсов 80 МГц и длительностью 120 фс. Детекцию времён жизни флуоресценции осуществляли с помощью FLIM-модуля TCSPC («Becker & Hickl GmbH», Германия), основанного на время-коррелированном счёте единичных фотонов. Для получения изображений использовали масляный иммерсионный объектив 40×/1.3. Возбуждение флуоресценции NAD(P)H осуществляли в двухфотонном режиме на длине волны 750 нм, сигнал принимали в диапазоне 450–490 нм. Мощность возбуждающего излучения составила 7 мВт. Время сбора фотонов составляло 60 с. Количество фотонов в пикселе было не менее 5000. Во время эксперимента клетки находились в инкубаторе при 37 °C, 5% CO₂. Данные FLIM обрабатывали в программе SPCImage («Becker & Hickl GmbH»). Для получения параметров кривых затухания в каждом пикселе использовали аппроксимацию методом наименьших квадратов. Кривые затухания флуоресценции NAD(P)H были аппроксимированы биэкспоненциальной моделью. Точность аппроксимации оценивали посредством параметра χ^2 . Для всех данных χ^2 лежал в диапазоне от 0,8 до 1,2. Были оценены короткая и длинная компоненты затухания (τ_1 и τ_2 соответственно), относительные амплитуды этих компонент (α_1 и α_2), а также среднее время жизни флуоресценции ($\tau_m = \alpha_1\tau_1 + \alpha_2\tau_2$). Анализ аутофлуоресценции проводили по клеточно в области цитоплазмы клетки. Для каждой группы были получены не менее 5 изображений с общим числом клеток не менее 30.

Оценка гликолитической активности клеток по содержанию лактата в культуральной среде. Клетки U87MG и T98G высевали на 6-луночный планшет по 5×10^5 клеток на лунку и культивировали в среде с глутамином либо без глутамин в течение 20 ч. Затем культуральную среду собирали и депротеинизировали с помощью набора для депротеинизации (ab204708, «Abcam», США), по инструкции производителя. Образцы анализировали с помощью набора для колориметрического анализа лактата (MAK064, «Sigma-Aldrich», США), по протоколу производителя. Количество лактата оценивали по оптической плотности раствора на длине вол-

ны 570 нм с помощью микропланшетного ридера SYNERGYmx («BioTek», США).

Проточная цитометрия. Для анализа поверхностной экспрессии рецептора DR5 клетки U87MG и T98G высевали в 6-луночные планшеты по 2×10^5 клеток на лунку и культивировали при 37 °C, 5% CO₂ с добавлением либо в отсутствие глутамин в течение не менее 72 ч. Клетки открепляли раствором Версена, промывали ледяным PBS, ресуспендировали в буфере FACS (1%-ный BSA в PBS) и инкубировали в течение 1 ч при 4 °C с моноклональными антителами (5 мкг/мл) к DR5. После этого клетки дважды промывали и инкубировали в течение 1 ч при 4 °C со вторичными антителами Dylight 488 (20 мкг/мл), промывали и ресуспендировали в буфере FACS с йодидом пропидия. Экспрессию рецептора DR5 определяли с помощью проточного цитометра CytoFlex («Beckman Coulter», Бреа, Индиана, США) с использованием мышиного IgG1 в качестве изотипического контроля.

Получение рекомбинантного DR5-специфичного варианта TRAIL DR5-B. Рекомбинантный белок DR5-B был экспрессирован в клетках *E. coli* SHuffle B и очищен из растворимой клеточной фракции с помощью никель-аффинной и ионообменной хроматографии, как описано ранее [28].

Тест на цитотоксичность. Клетки U87MG либо T98G рассаживали в 96-луночные планшеты по 1×10^4 клеток на лунку. Спустя 24 ч к клеткам добавляли темозоломид («Macklin», Китай), DR5-B либо GMX1778 в указанных концентрациях и инкубировали в течение 72 ч. Темозоломид и GMX1778 предварительно растворяли в ДМСО в концентрации 1 M и 100 mM соответственно и добавляли к клеткам таким образом, чтобы итоговое содержание ДМСО в лунке не превышало 0,5% и не проявляло цитотоксического эффекта. Затем к клеткам добавляли 0,05%-ный МТТ, инкубировали 4 ч и растворяли образовавшиеся кристаллы в ДМСО (100 мкл на лунку). Измеряли поглощение при 570 нм на планшетном спектрофотометре iMark («Bio-Rad», США).

Статистический анализ. Полученные данные имели нормальное распределение и выражались как среднее или среднее $\pm$ стандартное отклонение. Нормальность распределения оценивалась по критерию Шапиро–Уилка. Значимых выбросов не наблюдалось. Статистический анализ всех результатов, кроме дифференциальной экспрессии генов, проводился с использованием *t*-критерия Стьюдента. Эксперименты проводились в трёх повторностях. Результаты были обработаны с помощью программы GraphPad Prism 8.0.1 («GraphPad Software»). Значимыми считались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Клетки глиобластомы человека U87MG обладают более дифференцированным фенотипом по сравнению с T98G. В работе были исследованы клеточные линии глиобластомы человека U87MG и T98G. Для сравнения особенностей и различий двух линий было проведено секвенирование транскриптомов в стандартных условиях культивирования. Анализ GSEA дифференциальной экспрессии генов между клеточными линиями U87MG и T98G из базы данных GO:BP показал повышенную активность генов, связанных с главным комплексом гистосовместимости II класса в клетках U87MG относительно T98G (рис. 1, а). Похожие результаты были получены при анализе генов из субколлекций GO:CC и GO:MF (рис. 1, б). Это может свидетельствовать о том, что эти клетки обладают более дифференцированным фенотипом по сравнению с T98G [29, 30]. Анализ

с использованием наборов генов из коллекций KEGG, WP, Reactome и PID (рис. 2, а) показал в клетках U87MG повышенную активность генов, участвующих в процессах передачи сигнала за счёт генерации вторичных сигнальных молекул, а также в сигнальном пути PD-1, который может служить одним из факторов клеточной резистентности к действию TRAIL [31]. Кроме того, был проведён анализ GSEA с использованием наборов генов-мишеней транскрипционных факторов (TF) (коллекция TFT-Legacy), которые могут косвенно указывать на активность генов, находящихся под контролем определённых TF (рис. 2, б). Транскрипционная активность генов под контролем TF EN, RSRFC4 (MEF2A), EVI1 (MECOM), FOXJ2, CDPCR3 (CUTL1, CUX1), RORA2 (RORA), NKX25 (NKX2-5), PAX4, HFN1 (FOXQ1) и FOXD3 была повышена в клетках U87MG относительно T98G. Активность этих TF важна для регуляции клеточной дифференцировки, что указывает на более

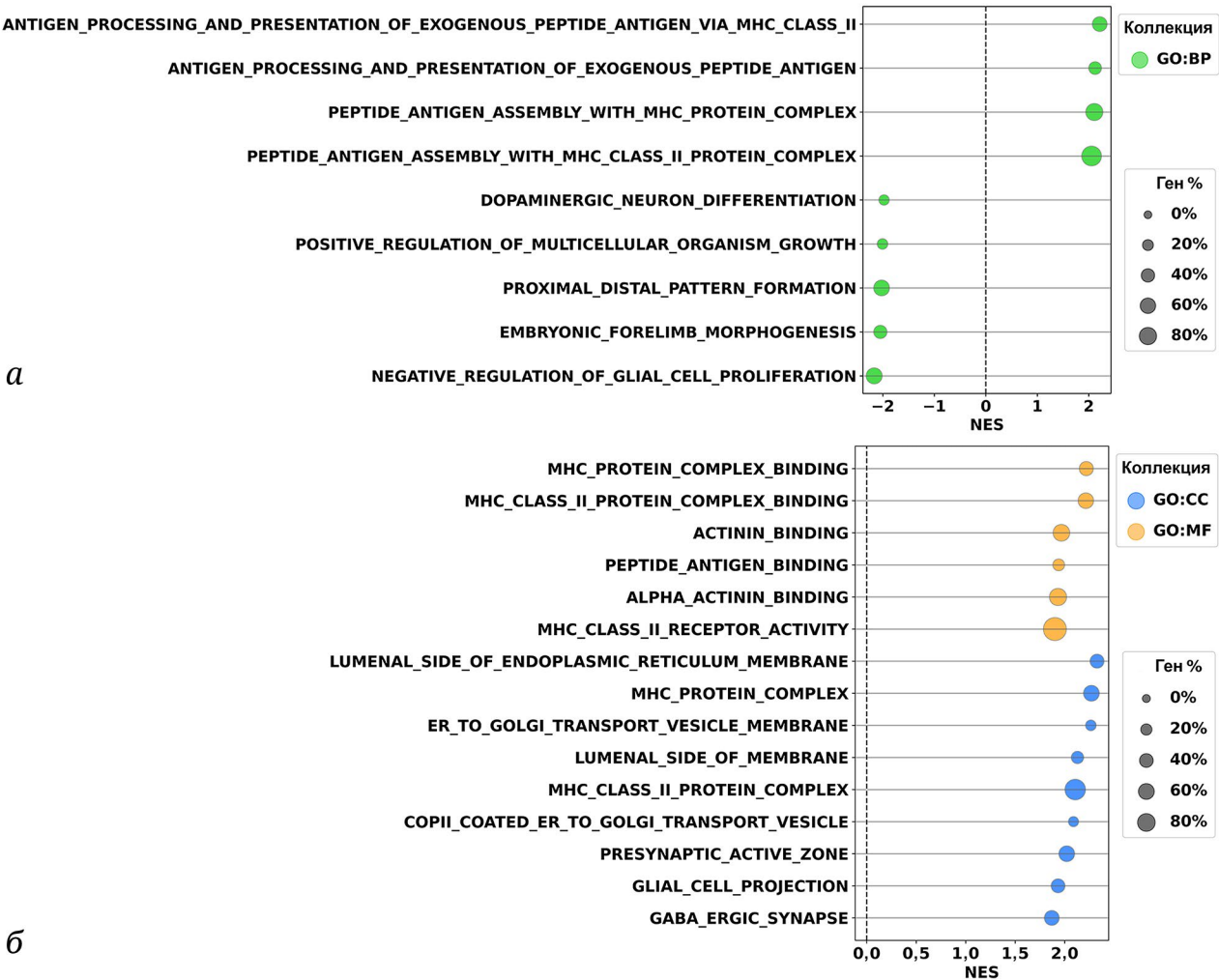


Рис. 1. Сравнительный анализ наборов генов GSEA в клетках U87MG относительно T98G. Результаты GSEA: а – для коллекций GO:BP; б – для GO:CC и GO:MF. Диаметр круга пропорционален количеству генов с разным уровнем экспрессии по сравнению с общим количеством генов в наборе. NES – нормализованный показатель обогащения. FDR ≤ 0,05

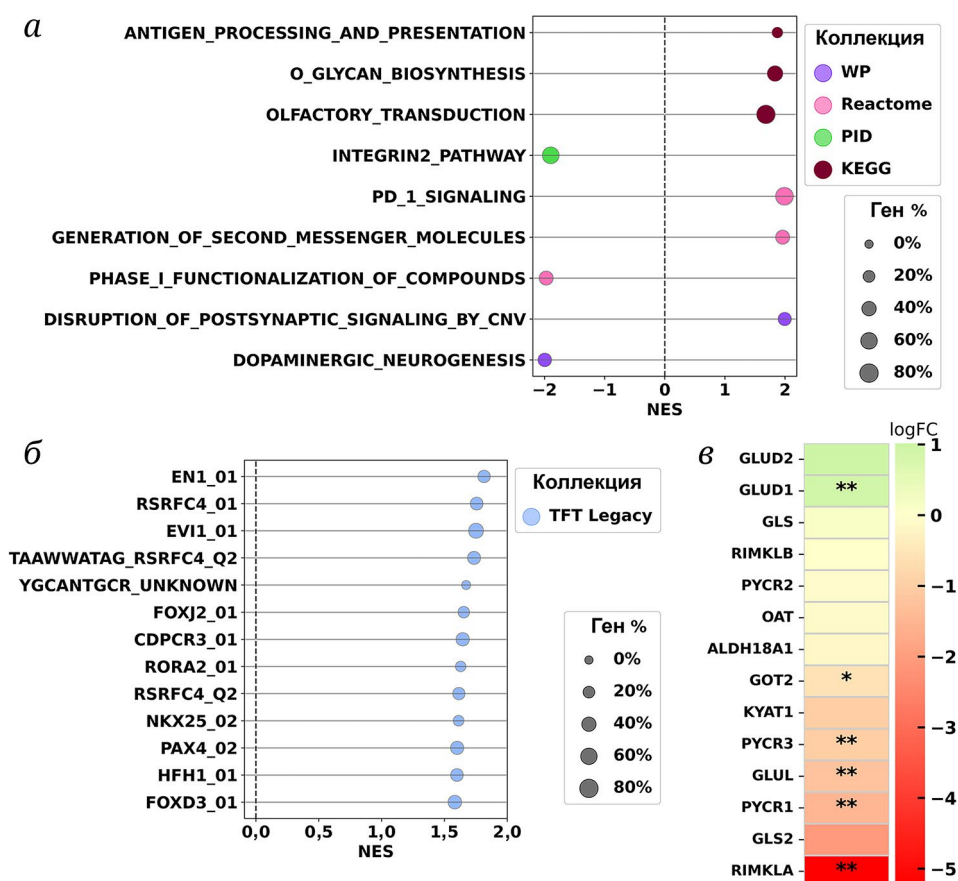


Рис. 2. Сравнительный анализ наборов генов GSEA в клетках U87MG относительно T98G. Результаты GSEA: а – для коллекций KEGG, PID, Reactome, WP; б – TFT Legacy. Диаметр круга пропорционален количеству генов с разным уровнем экспрессии по сравнению с общим количеством генов в наборе. NES – нормализованный показатель обогащения. FDR ≤ 0,05. в – Кратность изменения экспрессии генов, ассоциированных с метаболизмом глутамина, из базы данных Reactome Glutamate and Glutamine Metabolism в культуре клеток U87MG относительно T98G (logFC). * FDR ≤ 0,05, ** FDR ≤ 0,01

дифференцированный фенотип U87MG по сравнению с T98G.

Клетки U87MG и T98G отличаются по уровню транскрипционной активности генов, ассоциированных с метаболизмом глутамина. Анализ изменения транскрипционной активности генов, ассоциированных с метаболизмом глутамина, из базы данных GSEA MSigDB Reactome Glutamate and Glutamine Metabolism показал, что в клетках U87MG относительно T98G статистически значимо повышена экспрессия глутамат-дегидрогеназы 1 (GLUD1), участвующей в катаболизме глутамата [32], но не её паралога GLUD2 (рис. 2, в). В то же время экспрессия ряда других генов в клетках U87MG была значимо ниже, чем в T98G, а именно: митохондриальной аспарат-аминотрансферазы (GOT2), что ассоциировано со сниженным метаболизмом глутамина и клеточной сенесцентностью [33]; цитоплазматической (PYCR3) и митохондриальной (PYCR1) пирролин-5-карбоксилатредуктаз, катализирующих биосинтез пролина из глутамата в качестве пре-

курсора [34]; глутамин-синтетазы (GLUL), катализирующей эндогенный синтез глутамина из глутамата [32]; и N-ацетил-аспартил-глутамат-синтазы A (NAAGSA, RIMKLA), метаболизирующей глутамат [35]. Достоверных изменений экспрессии других генов, участвующих в метаболизме глутамина, не наблюдалось (рис. 2, в).

При депривации глутамина снижается скорость роста клеток U87MG и T98G и повышается экспрессия маркера стволовых клеток CD133 и ингибиторов циклин-зависимых киназ p21^{Waf1} и p27^{KIP1} в клетках U87MG. Культивирование клеток в отсутствие глутамина в разной степени приводило к снижению скорости роста исследуемых клеточных линий U87MG и T98G (рис. 3, а), что соответствует ранее опубликованным данным [36, 37]. Поскольку клетки U87MG и T98G отличались по исходной степени дифференцировки, мы оценили изменение экспрессии маркера стволовых клеток глиомы CD133 при депривации глутамина с помощью ПЦР в реальном времени. Уровень экспрессии CD133 возрастал

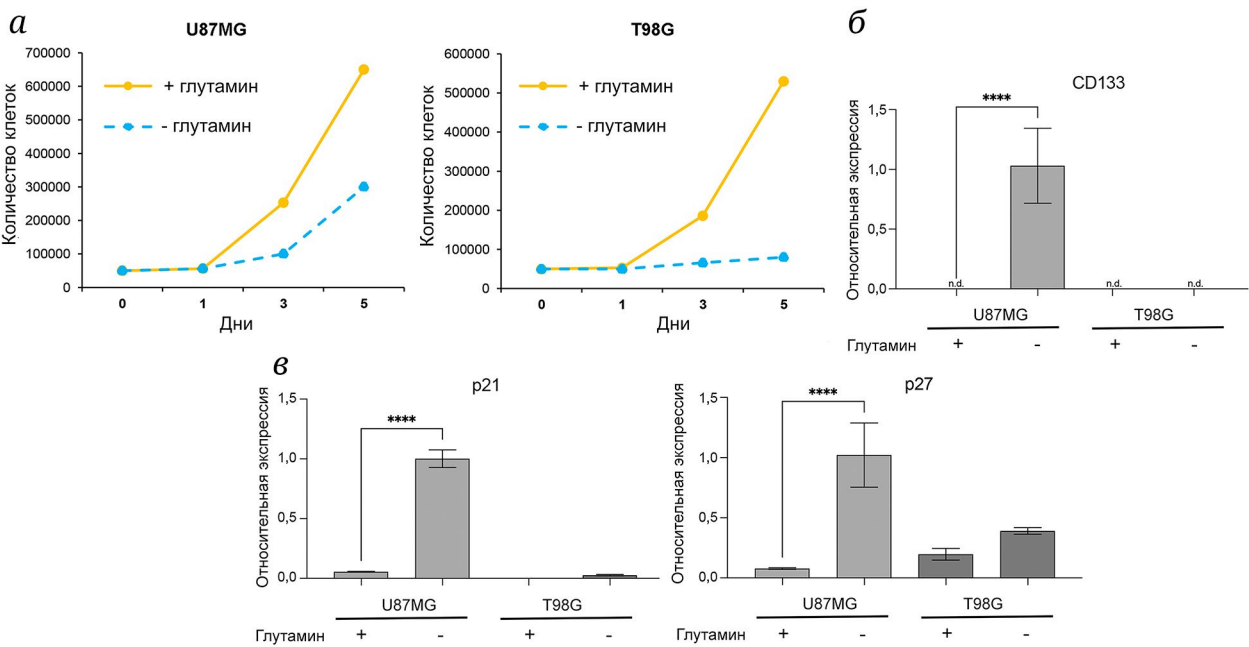


Рис. 3. Влияние депривации глутамина на линии клеток U87MG и T98G. а – Скорость роста клеток U87MG и T98G в отсутствие либо в присутствии глутамина. Изменение уровней экспрессии на уровне мРНК, определенное методом ПЦР в реальном времени: б – CD133, в – p21^{Waf1} и p27^{KIP1}. **** *p* < 0,005

Таблица 2. Параметры аутофлуоресценции NADH в клетках U87MG и T98G в отсутствие либо в присутствии глутамина (среднее значение ± стандартное отклонение)

Клеточная линия	Глутамин	τm, нс	τ1, нс	τ2, нс	α1, %
U87MG	+	0,84 ± 0,07	0,42 ± 0,03	2,47 ± 0,19	79,31 ± 1,74
	-	0,74 ± 0,07* <i>p</i> < 0,001	0,37 ± 0,04 <i>p</i> < 0,001	2,32 ± 0,18 <i>p</i> < 0,001	81,16 ± 1,60* <i>p</i> < 0,001
T98G	+	0,86 ± 0,08	0,46 ± 0,04	2,46 ± 0,21	79,84 ± 1,95
	-	0,99 ± 0,10* <i>p</i> < 0,001	0,51 ± 0,05* <i>p</i> < 0,001	2,73 ± 0,24 <i>p</i> < 0,001	77,56 ± 2,07* <i>p</i> < 0,001

Примечание. τ1 и τ2 – времена жизни флуоресценции свободной и связанной с белком формы NADH соответственно, τm – среднее время жизни флуоресценции NADH, α1 – процентный вклад свободной формы NADH. * Достоверное отличие от контроля, *p* < 0,001.

в клетках U87MG, что может указывать на процесс дедифференцировки этих клеток. В клетках T98G маркер CD133 не определялся независимо от присутствия глутамина (рис. 3, б). Аналогичный эффект наблюдался для экспрессии ингибиторов циклин-зависимых киназ p21^{Waf1} и p27^{KIP1}: значимое повышение экспрессии наблюдалось в U87MG, но не T98G (рис. 3, в).

Депривация глутамина вызывает контрастные метаболические эффекты в клетках U87MG и T98G, выявленные методом FLIM. Изменения в метаболизме опухолевых клеток U87MG и T98G при депривации глутамина исследовали с помощью метаболического имиджинга на основе двухфотонной FLIM по аутофлуоресценции кофермента NADH. Фосфорилированной формы NADPH,

которая характеризуется наибольшим временем жизни флуоресценции ~4,4 нс [38], в проанализированных клеточных культурах обнаружено не было. При культивировании с глутамином процентные вклады свободной (α1) и связанной форм NADH для клеток U87MG и T98G исходно не отличались (табл. 2). Анализ параметров аутофлуоресценции NADH показал, что времена жизни свободной (τ1) и связанной с белком (τ2) форм соответствовали типичным значениям [39, 40]. При депривации глутамина у клеток U87MG наблюдалось снижение среднего времени жизни флуоресценции (τm), времени жизни свободной формы (τ1) и повышение вклада свободной формы (α1), что в совокупности может говорить о сдвиге метаболического статуса клеток в сторону гликолиза.

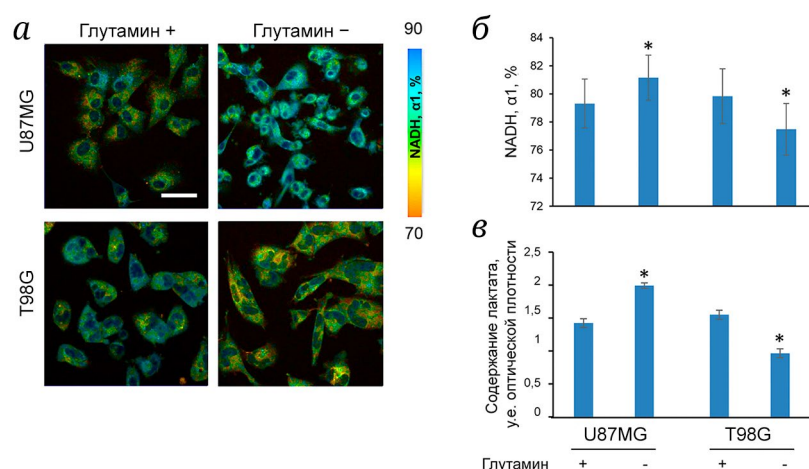


Рис. 4. Исследование метаболического статуса клеток U87MG и T98G при депривации глутамина. *а* – Микроскопические псевдоокрашенные FLIM-изображения отношения вклада свободной формы NADH, α1, масштабная линейка = 50 мкм для всех изображений. *б* – Количественная оценка NADH, α1, методом FLIM. Столбчатые диаграммы отражают среднее значение ± стандартную ошибку среднего. * Статистически значимое отклонение от группы «глутамин+», $p < 0,005$. *в* – Оценка содержания лактата в культуральной среде колориметрическим методом при длине волны 570 нм. Столбчатые диаграммы отражают среднее значение оптической плотности раствора ± стандартное отклонение, * $p < 0,001$

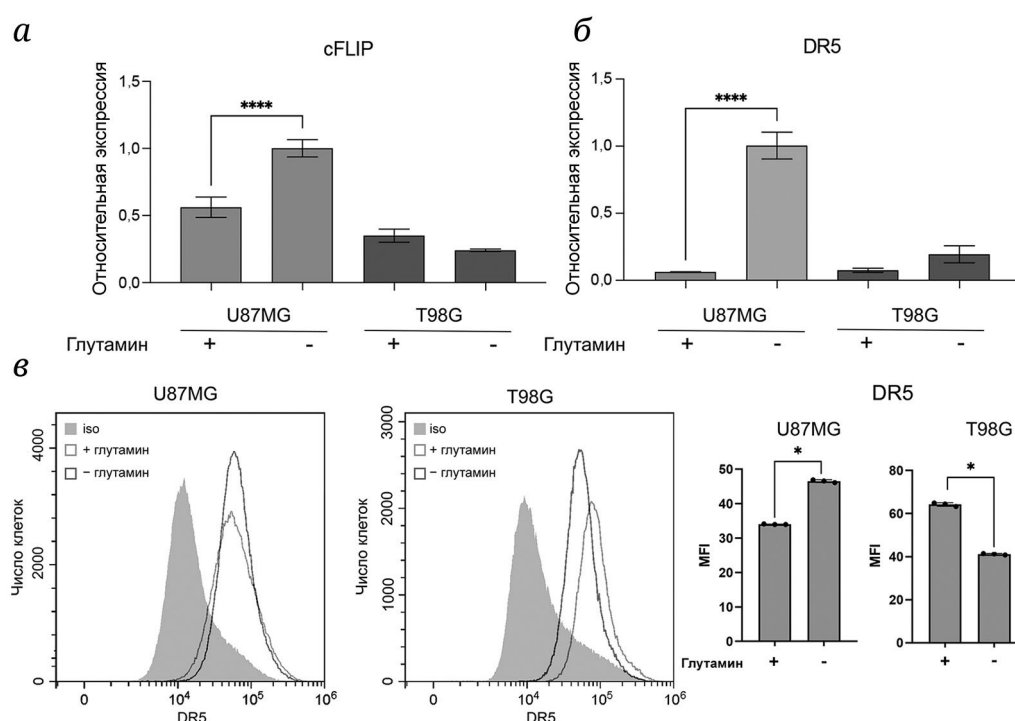


Рис. 5. Исследование экспрессии DR5 и cFLIP в линиях клеток U87MG и T98G. *а* – Экспрессия cFLIP; *б* – экспрессия DR5 на уровне мРНК, **** $p < 0,005$. *в* – Экспрессия DR5 на поверхности клеток, * $p < 0,05$. MFI – средняя интенсивность флуоресценции

При этом время жизни связанной с белком формы (τ_2) оставалось без изменений. У клеток линии T98G, наоборот, наблюдалось увеличение параметров τ_1 и τ_2 и значимо снижался вклад свободной компоненты α_1 , ассоциированной с гликолизом, что позволяет делать вывод о сдвиге метаболизма в сторону окислительного фосфорилирования (OXPHOS) [41] (рис. 4, а, б, табл. 2).

Депривация глутамина по-разному модулирует содержание лактата в культуральной среде клеток U87MG и T98G. Наблюдалось значимое увеличение продукции лактата клетками U87MG, культивируемыми в среде без глутамин: при оценке колориметрическим методом оптическая плотность составила $1,99 \pm 0,04$ против $1,42 \pm 0,07$ в присутствии глутамин ($p < 0,01$).

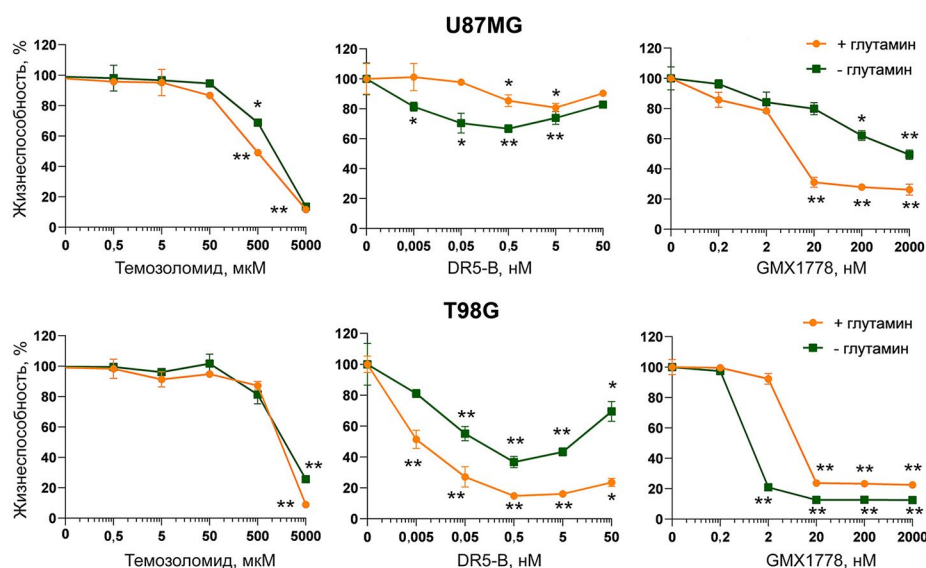


Рис. 6. Цитотоксическая активность темозоломида, TRAIL DR5-B и ингибитора NAMPT GMX1778 на линиях клеток глиобластомы U87MG и T98G в стандартных условиях и при депривации глутамина, МТТ-тест. Значимость по сравнению с контролем: * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$

Для клеток T98G, напротив, при депривации глутамина наблюдалось снижение оптической плотности раствора с $1,55 \pm 0,05$ до $0,96 \pm 0,07$, $p < 0,01$ (рис. 4, в). Полученные данные подтверждают изменения, наблюдаемые с помощью FLIM.

Депривация глутамина модулирует экспрессию компонентов сигнального пути цитокина TRAIL. В недавней работе депривация глутамина в клетках рака поджелудочной железы приводила к снижению экспрессии антиапоптотического белка cFLIP, гомолога каспазы-8 без протеазной активности, тем самым повышая чувствительность клеток к цитотоксическому действию цитокина TRAIL; при этом не изменялась поверхностная экспрессия рецептора DR5, мишени TRAIL [42]. Однако в наших экспериментах на клетках глиобластомы наблюдались разнонаправленные эффекты: при депривации глутамина экспрессия cFLIP в клетках U87MG повышалась, а в клетках T98G не изменялась (рис. 5, а).

При этом в U87MG также наблюдалось повышение экспрессии рецептора DR5 как на уровне мРНК, что было определено с помощью ПЦР в реальном времени (рис. 5, б), так и на поверхности клеток, что было определено с помощью проточной цитометрии (рис. 5, в), тогда как для T98G наблюдалась противоположная тенденция (рис. 5, б, в). Это говорит о том, что не только клетки разных типов опухолей, но также разные линии одного типа опухоли могут по-разному отвечать на депривацию глутамина.

Депривация глутамина в клетках U87MG и T98G приводит к противоположным эффектам при терапевтических воздействиях. Несмотря на предполагаемую взаимосвязь депривации

глутамина с химиорезистентностью опухолей, в наших экспериментах депривация глутамина не влияла на чувствительность клеток обеих линий к темозоломиду (рис. 6, а). Однако чувствительность клеток к таргетному DR5-специфичному цитокину TRAIL DR5-B существенно отличалась: депривация глутамина сенсibilizировала DR5-B-резистентные клетки U87MG, тогда как исходно DR5-B-чувствительные клетки T98G, напротив, стали более устойчивы к DR5-опосредованной клеточной гибели (рис. 6, б). Подобный гетерогенный ответ клеток U87MG и T98G на DR5-B коррелирует с разнонаправленным изменением экспрессии DR5 и cFLIP в этих клетках (рис. 5). Под действием ингибитора NAMPT GMX1778 также наблюдался контрастный эффект: в отсутствие глутамина повысилась резистентность клеток U87MG, но при этом клетки T98G сенсibilizировались к GMX1778 (рис. 6, в).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Метаболизм аминокислот, в частности глутамина, играет важную роль в развитии опухолей. В связи с этим исследование влияния депривации глутамина на опухолевые клетки важно как для выявления биохимических процессов, протекающих в опухолях, так и для разработки новых потенциальных методов терапии путём лекарственной депривации аминокислот. В данной работе было исследовано влияние депривации глутамина на две клеточные линии глиобластомы человека, U87MG и T98G, отличающиеся по ряду характеристик. Транскриптомный анализ выявил

исходно более дифференцированный фенотип клеточной линии U87MG по сравнению с T98G. Также данные о дифференциальной активности генов, ассоциированных с метаболизмом глутамина, из базы данных GSEA MSigDB Reactome Glutamate and Glutamine Metabolism в клетках U87MG относительно T98G (повышенная экспрессия GLUD1 и пониженная экспрессия GOT2, PYCR3, PYCR1, GLUL, RIMKLA) указывали на возможные различия в восприимчивости клеток к депривации глутамина, что и наблюдалось в последующих экспериментах.

В частности, при культивировании в отсутствие глутамина в клетках U87MG, в отличие от T98G, наблюдалось повышение экспрессии маркера стволовых клеток CD133. Это может указывать на процесс дедифференцировки клеток U87MG, что поддерживается рядом исследований. К примеру, в исследовании Pan et al. региональный дефицит глутамина в глубине опухоли приводил к гиперметилированию гистонов и вызывал дедифференцировку опухолевых клеток [6]. Кроме того, была показана дедифференцировка дифференцированных клеток глиобластомы в центральной зоне опухоли в результате гипоксии, что сопровождалось повышением экспрессии маркеров стволовости и закислением коровой области [43, 44]. В целом, процесс дедифференцировки опухолевых клеток при различных воздействиях с активацией генов стволовости и приобретением свойств, подобных свойствам раковых стволовых клеток, описан в литературе [45].

Существуют противоречивые данные относительно влияния глутамина на степень стволовости опухолевых клеток. К примеру, депривация глутамина или ингибирование глутаминазы 1 (GLS1), конвертирующей глутамин в глутамат, снижали экспрессию генов, связанных со стволовостью, в клетках гепатоцеллюлярной карциномы [46]. Аналогично депривация глутамина ингибировала самообновление опухолевых клеток и снижала экспрессию генов, связанных со стволовостью, в стволовых клетках рака поджелудочной железы [47]. Напротив, в другой работе наблюдалось, что недостаток глутамина в клетках рака яичника и толстой кишки вызывал метаболическое перепрограммирование, приводя к усилению гликолиза, снижению пролиферации и увеличению популяции опухолевых стволовых клеток [48]. Подобные противоречивые эффекты наблюдались нами в линиях U87MG и T98G.

Снижение скорости пролиферации при депривации глутамина в наших экспериментах наблюдалось в обеих линиях, но было сильнее выражено для клеток T98G, чем для U87MG. Имеются данные о различной зависимости скорости роста клеток глиобластомы от глутамина: отсут-

ствие экзогенного глутамина ограничивало пролиферацию клеточных линий глиом D-54 MG, U-118 MG и U-251 MG, но не U-373 MG, D-245 MG и D-259 MG [36]. Позже было показано, что стволовые клетки глиом способны расти независимо от экзогенного глутамина, что связано с повышенной экспрессией в них GLUL [49]. Однако в недавней работе было показано, что опухоль из клеточной линии U87MG, наоборот, является зависимой от глутамина [50], что коррелирует с пониженным уровнем экспрессии GLUL и повышенным уровнем экспрессии GLUD1 (рис. 2, в), также детерминирующей зависимость от глутамина [51]. Это может свидетельствовать об отсутствии в ней популяции стволовых клеток, поддерживая наши выводы о высокой степени дифференцировки U87MG. К сожалению, в клетках T98G не наблюдалось экспрессии CD133, что, однако, не противоречит её более низкой степени дифференцировки, так как степень стволовости и дифференцировки определяется по экспрессии целого ряда маркеров, среди которых CD133 не является наиболее специфическим [45].

Известно, что ингибиторы циклин-зависимых киназ p21^{Waf1} и p27^{KIP1} препятствуют пролиферации и тем самым поддерживают дормантное состояние стволовых клеток и их способность к самообновлению [52]. Следовательно, повышение экспрессии p21^{Waf1} и p27^{KIP1} в клетках U87MG, наряду с повышением CD133, коррелирует с литературными данными, по которым активация p21^{Waf1} и p27^{KIP1} поддерживала дормантное состояние CD133+ стволовых клеток [53]. Это также подтверждает нашу гипотезу о дедифференцировке клеток U87MG при депривации глутамина. При этом в клетках T98G, в отличие от U87MG, повышение экспрессии p21^{Waf1} и p27^{KIP1} не было статистически значимым. Это может быть связано с наличием у них мутации в гене TF p53 [54], поскольку в T98G пролиферация была тем не менее ингибирована с помощью альтернативных механизмов.

Выявленные нами различия между клеточными линиями U87MG и T98G при культивировании в отсутствие глутамина сопровождались противоположными метаболическими процессами. Наши результаты по исследованию аутофлуоресценции кофермента NADH с помощью метаболического имиджинга на основе FLIM показали сдвиг метаболической активности в сторону гликолиза в клетках U87MG, который был также подтверждён повышением продукции лактата. Этот результат коррелирует с ранее опубликованными данными: например, в недавней работе было показано, что депривация глутамина в клетках колоректального рака и рака поджелудочной железы приводит к закислению лизосом и индукции аутофагии, способствующей выживанию.

Там же был показан метаболический сдвиг в сторону гликолиза при недостатке глутамина с помощью стресс-теста на гликолиз Seahorse™ и с помощью платформы для мультисенсорного клеточного анализа CYRIS® flox [37]. Также было показано усиление гликолиза в качестве адаптивного ответа на недостаток глутамина в клетках глиобластомы [8]. Поскольку ранее было показано переключение метаболической активности в сторону OXPHOS при дифференцировке стволовых [55, 56] и индуцированных плюрипотентных клеток [57, 58], наблюдаемый нами противоположный сдвиг в сторону гликолиза при депривации глутамина в U87MG является независимым подтверждением обратного процесса, т.е. дедифференцировки этих клеток.

В клетках T98G, в отличие от U87MG, метаболические изменения при депривации глутамина были ассоциированы со сдвигом в сторону OXPHOS – как по аутофлуоресценции NADH, так и по снижению продукции лактата. Ранее нами и другими исследователями было показано, что эти изменения коррелируют со стрессовой реакцией клеток в ответ на неблагоприятное воздействие. В частности, сдвиг в сторону OXPHOS является типичной реакцией на воздействие химиопрепаратов, в том числе для клеток глиом [59, 60]. Возможно, разнонаправленные сдвиги в сторону гликолиза либо OXPHOS, наблюдаемые при депривации глутамина в линиях U87MG и T98G соответственно, обусловлены метаболической пластичностью опухолевых клеток, которая может определять чувствительность опухолевых клеток к терапии. К примеру, в метформин-чувствительной линии колоректального рака HT29 наблюдался высокий уровень OXPHOS, тогда как метформин-устойчивые клетки линии SW620 имели низкий уровень OXPHOS, но при депривации глутамина приобретали чувствительность к метформину [61]. Также есть данные о противоположном влиянии глутамина на чувствительность клеток

нейробластомы к химиопрепаратам: депривация глутамина подавляла апоптоз, индуцированный этопозидом, но стимулировала апоптоз, индуцированный цисплатином [62].

С учётом этих данных на следующем этапе работы была исследована чувствительность линий U87MG и T98G к терапевтическим воздействиям препаратами различной природы: конвенциональным препаратом темозоломидом, DR5-специфичным цитокином TRAIL DR5-B и таргетным ингибитором NAMPT. Депривация глутамина не оказывала влияния на чувствительность ни клеток U87MG, ни T98G к темозоломиду, но при этом существенно изменялась чувствительность обеих линий к двум другим таргетным препаратам.

Клетки U87MG исходно резистентны к цитокину TRAIL DR5-B, в отличие от T98G, что коррелирует с их высокой степенью дифференцировки, т.к. известно, что по мере дифференцировки клеток снижается поверхностная экспрессия рецепторов смерти TRAIL [63, 64]. В соответствии с этим, при депривации глутамина в клетках U87MG наблюдалось повышение экспрессии DR5 и усиление DR5-опосредованной клеточной гибели, хотя сенсibiliзирующий эффект не был ярко выражен, по-видимому, за счёт повышения cFLIP либо из-за наличия мутации в гене, кодирующем фосфатазу PTEN [54]. Эти результаты коррелируют с данными о повышении чувствительности клеток рака молочной железы (ПМЖ) [65] и рака поджелудочной железы к TRAIL-опосредованному апоптозу при депривации глутамина [42]. Аналогично острая депривация глутамина вызывала апоптоз опухолевых клеток, запускаемый CD95-опосредованным каспазным каскадом [66]. Однако следует заметить, что клеточная линия T98G, исходно высокочувствительная к DR5-опосредованной клеточной гибели, напротив, в отсутствие глутамина становилась более устойчивой к DR5-B, что сопровождалось снижением экспрессии DR5. Интересно, что похожие результаты были ранее

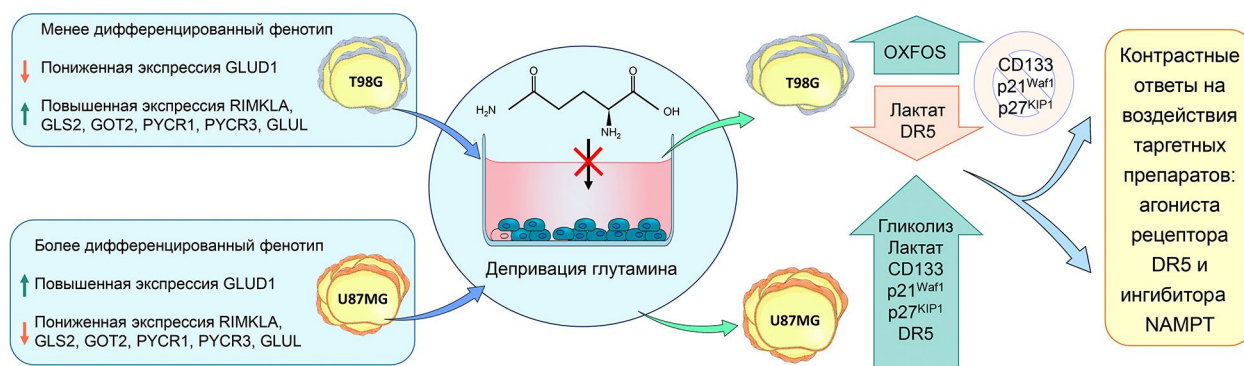


Рис. 7. Схематическое изображение противоположных эффектов, наблюдаемых в клеточных линиях глиобластомы человека U87MG и T98G при депривации глутамина

получены на линиях РМЖ: депривация глутамина в клетках трижды негативного РМЖ с базальным (мезенхимным) фенотипом увеличивала их чувствительность к TRAIL, тогда как линии клеток РМЖ с люминальным фенотипом были рефрактерны к сенсibilизации к TRAIL при депривации глутамина [67]. Поскольку сигнальный путь TRAIL играет важную роль в иммунологическом надзоре за опухолевыми клетками, наши результаты дополняют известный факт, что метаболизм глутамина может модулировать противоопухолевый иммунный ответ [68].

NAMPT также является перспективной мишенью в глиобластоме: в частности, её экспрессия коррелирует со степенью стволовости глиобластомы и прогнозом для пациентов [69]. Поскольку глутамин является одним из источников NAD(P)H [3], а NAMPT является лимитирующей стадией биосинтеза NAD, катализируя образование его промежуточного продукта никотинамидмононуклеотида, очевидно, что эти метаболические пути взаимосвязаны. Свежие данные говорят о том, что одновременное лекарственное ингибирование глутаминализа и синтеза NAD может быть успешной стратегией терапии рака [70]. Как и в случае с TRAIL DR5-B, при культивировании в отсутствие глутамина в клетках U87MG и T98G также наблюдались контрастные эффекты: клетки T98G сенсibilizировались к ингибитору NAMPT GMX1778, тогда как U87MG приобретали устойчивость. Этот результат коррелирует с опубликованными данными о том, что устойчивость опухолевых клеток к ингибитору NAMPT связана со сдвигом в сторону гликолиза [71], который мы наблюдали в клетках U87MG. Важно отметить, что изменения чувствительности клеток U87MG и T98G к GMX1778 при депривации глутамина были противоположны изменениям чувствительности к DR5-опосредованной клеточной гибели, однако механизмы данного явления ещё предстоит изучить.

Схематическое изображение эффектов, наблюдаемых в клеточных линиях U87MG и T98G при депривации глутамина, показано на рис. 7.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На примере двух клеточных линий, U87MG и T98G, была показана фенотипическая и метаболическая гетерогенность клеток глиобластомы человека. При депривации глутамина различия этих клеточных линий в исходной степени дифференцировки и метаболическая пластичность послужили причиной разнонаправленных метаболических изменений и контрастных ответов на воздействия различными таргетными препаратами. Наши данные в перспективе послужат эффективному подбору пациентов, способных ответить на различные виды таргетной терапии, на основании фенотипического и метаболического статуса опухоли. Кроме того, полученные результаты могут помочь выявлению механизмов резистентности опухолей, ассоциированных с метаболизмом глутамина, и способствовать разработке схем лекарственной депривации глутамина для усиления эффективности противоопухолевой терапии.

Вклад авторов. А.В. Яголович – концепция и руководство работой; А.А. Исакова, Д.В. Мазур, К.С. Краснов, И.Н. Дружкова, А.М. Можеров – проведение экспериментов; Н.В. Антипова, И.Н. Дружкова, Р.С. Фадеев, М.Э. Гаспарян – обсуждение результатов исследования; А.В. Яголович – написание текста; М.Э. Гаспарян – редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 24-24-00222, <https://rscf.ru/project/24-24-00222/>.

Благодарности. Авторы выражают искреннюю признательность Д.Н. Казюлькину, А.В. Куркину за предоставленный GMX1778 и В.В. Татарскому за предоставленные праймеры, а также Б.В. Черняку и М.В. Ширмановой за ценные комментарии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bergström, J., Fürst, P., Norée, L. O., and Vinnars, E. (1974) Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue, *J. Appl. Physiol.*, **36**, 693-697, <https://doi.org/10.1152/jappl.1974.36.6.693>.
2. Yang, L., Venneti, S., and Negrath, D. (2017) Glutaminolysis: a hallmark of cancer metabolism, *Annu. Rev. Biomed. Engin.*, **19**, 163-194, <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071516-044546>.
3. DeBerardinis, R. J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., et al. (2007) Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 19345-19350, <https://doi.org/10.1073/pnas.0709747104>.
4. Shanware, N. P., Bray, K., Eng, C. H., Wang, F., Follettie, M., et al. (2014) Glutamine deprivation stimulates mTOR-JNK-dependent chemokine secretion, *Nat. Commun.*, **5**, 4900, <https://doi.org/10.1038/ncomms5900>.

5. Yuneva, M., Zamboni, N., Oefner, P., Sachidanandam, R., and Lazebnik, Y. (2007) Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells, *J. Cell Biol.*, **178**, 93-105, <https://doi.org/10.1083/jcb.200703099>.
6. Pan, M., Reid, M. A., Lowman, X. H., Kulkarni, R. P., Tran, T. Q., et al. (2016) Regional glutamine deficiency in tumours promotes dedifferentiation through inhibition of histone demethylation, *Nat. Cell Biol.*, **18**, 1090-1101, <https://doi.org/10.1038/ncb3410>.
7. Márquez, J., Alonso, F. J., Matés, J. M., Segura, J. A., Martín-Rufián, M., et al. (2017) Glutamine addiction in gliomas, *Neurochem. Res.*, **42**, 1735-1746, <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2212-1>.
8. Yin, H., Liu, Y., Dong, Q., Wang, H., Yan, Y., et al. (2024) The mechanism of extracellular CypB promotes glioblastoma adaptation to glutamine deprivation microenvironment, *Cancer Lett.*, 216862, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2024.216862>.
9. Jia, J. L., Alshamsan, B., and Ng, T. L. (2023) Temozolomide chronotherapy in glioma: a systematic review, *Curr. Oncol.*, **30**, 1893-1902, <https://doi.org/10.3390/curroncol30020147>.
10. Kuijlen, J. M., Mooij, J. J. A., Platteel, I., Hoving, E. W., Van Der Graaf, W. T., et al. (2006) TRAIL-receptor expression is an independent prognostic factor for survival in patients with a primary glioblastoma multiforme, *J. Neuro. Oncol.*, **78**, 161-171, <https://doi.org/10.1007/s11060-005-9081-1>.
11. Thang, M., Mellowes, C., Mercer-Smith, A., Nguyen, P., and Hingtgen, S. (2023) Current approaches in enhancing TRAIL therapies in glioblastoma, *Neuro Oncol. Adv.*, **5**, vdad047, <https://doi.org/10.1093/noajnl/vdad047>.
12. Galli, U., Colombo, G., Travelli, C., Tron, G. C., Genazzani, A. A., and Grolla, A. A. (2020) Recent advances in NAMPT inhibitors: a novel immunotherapeutic strategy, *Front. Pharmacol.*, **11**, 656, <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00656>.
13. Fung, M. K. L., and Chan, G. C.-F. (2017) Drug-induced amino acid deprivation as strategy for cancer therapy, *J. Hematol. Oncol.*, **10**, 144, <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0509-9>.
14. Jin, J., Byun, J.-K., Choi, Y.-K., and Park, K.-G. (2023) Targeting glutamine metabolism as a therapeutic strategy for cancer, *Exp. Mol. Med.*, **55**, 706-715, <https://doi.org/10.1038/s12276-023-00971-9>.
15. Jezierzański, M., Nafalska, N., Stopyra, M., Furgoń, T., Miciak, M., et al. (2024) Temozolomide (TMZ) in the treatment of glioblastoma multiforme – a literature review and clinical outcomes, *Curr. Oncol.*, **31**, 3994-4002, <https://doi.org/10.3390/curroncol31070296>.
16. Gasparian, M. E., Chernyak, B. V., Dolgikh, D. A., Yagolovich, A. V., Popova, E. N., et al. (2009) Generation of new TRAIL mutants DR5-A and DR5-B with improved selectivity to death receptor 5, *Apoptosis*, **14**, 778-787, <https://doi.org/10.1007/s10495-009-0349-3>.
17. Watson, M., Roulston, A., Bélec, L., Billot, X., Marcellus, R., Bédard, D., Bernier, C., Branchaud, S., et al. (2009) The small molecule GMX1778 is a potent inhibitor of NAD⁺ biosynthesis: strategy for enhanced therapy in nicotinic acid phosphoribosyltransferase 1-deficient tumors, *Mol. Cell. Biol.*, **29**, 5872-5888, <https://doi.org/10.1128/MCB.00112-09>.
18. Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2, *Genome Biol.*, **15**, 550, <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
19. Liberzon, A., Subramanian, A., Pinchback, R., Thorvaldsdóttir, H., Tamayo, P., and Mesirov, J. P. (2011) Molecular signatures database (MSigDB) 3.0, *Bioinformatics*, **27**, 1739-1740, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr260>.
20. Fang, Z., Liu, X., and Peltz, G. (2023) GSEApY: a comprehensive package for performing gene set enrichment analysis in Python, *Bioinformatics*, **39**, btac757, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac757>.
21. Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., et al. (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology, *Nat. Genet.*, **25**, 25-29, <https://doi.org/10.1038/75556>.
22. Kanehisa, M. (2000) KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes, *Nucleic Acids Res.*, **28**, 27-30, <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>.
23. Gillespie, M., Jassal, B., Stephan, R., Milacic, M., Rothfels, K., et al. (2022) The reactome pathway knowledgebase 2022, *Nucleic Acids Res.*, **50**, D687-D692, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1028>.
24. Martens, M., Ammar, A., Riutta, A., Waagmeester, A., Slenter, D. N., et al. (2021) WikiPathways: connecting communities, *Nucleic Acids Res.*, **49**, D613-D621, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1024>.
25. Schaefer, C. F., Anthony, K., Krupa, S., Buchoff, J., Day, M., et al. (2009) PID: the pathway interaction database, *Nucleic Acids Res.*, **37**, D674-D679, <https://doi.org/10.1093/nar/gkn653>.
26. Xie, X., Lu, J., Kulbokas, E. J., Golub, T. R., Mootha, V., et al. (2005) Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals, *Nature*, **434**, 338-345, <https://doi.org/10.1038/nature03441>.
27. Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing, *J. R. Stat. Soc. Ser. B (Methodological)*, **57**, 289-300, <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>.

28. Yagolovich, A. V., Artykov, A. A., Dolgikh, D. A., Kirpichnikov, M. P., and Gasparian, M. E. (2019) A new efficient method for production of recombinant antitumor cytokine TRAIL and its receptor-selective variant DR5-B, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 627-636, <https://doi.org/10.1134/S0006297919060051>.
29. Suárez-Álvarez, B., Rodríguez, R. M., Calvanese, V., Blanco-Gelaz, M. A., Suhr, S. T., et al. (2010) Epigenetic mechanisms regulate MHC and antigen processing molecules in human embryonic and induced pluripotent stem cells, *PLoS One*, **5**, e10192, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010192>.
30. Vagaska, B., New, S. E. P., Alvarez-Gonzalez, C., D'Acquisto, F., Gomez, S. G., et al. (2016) MHC-class-II are expressed in a subpopulation of human neural stem cells *in vitro* in an IFN γ -independent fashion and during development, *Sci. Rep.*, **6**, 24251, <https://doi.org/10.1038/srep24251>.
31. Liu, R., Zeng, L.-W., Li, H.-F., Shi, J.-G., Zhong, B., et al. (2023) PD-1 signaling negatively regulates the common cytokine receptor γ chain via MARCH5-mediated ubiquitination and degradation to suppress anti-tumor immunity, *Cell Res.*, **33**, 923-939, <https://doi.org/10.1038/s41422-023-00890-4>.
32. Yoo, H. C., Yu, Y. C., Sung, Y., and Han, J. M. (2020) Glutamine reliance in cell metabolism, *Exp. Mol. Med.*, **52**, 1496-1516, <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00504-8>.
33. Yang, S., Hwang, S., Kim, M., Seo, S. B., Lee, J.-H., et al. (2018) Mitochondrial glutamine metabolism via GOT2 supports pancreatic cancer growth through senescence inhibition, *Cell Death Dis.*, **9**, 55, <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0089-1>.
34. Li, Y., Bie, J., Song, C., Liu, M., and Luo, J. (2021) PYCR, a key enzyme in proline metabolism, functions in tumorigenesis, *Amino Acids*, **53**, 1841-1850, <https://doi.org/10.1007/s00726-021-03047-y>.
35. Lodder-Gadaczek, J., Becker, I., Gieselmann, V., Wang-Eckhardt, L., and Eckhardt, M. (2011) N-acetylasparylglutamate synthetase II synthesizes N-acetylasparylglutamylglutamate, *J. Biol. Chem.*, **286**, 16693-16706, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.230136>.
36. Dranoff, G., Elion, G. B., Friedman, H. S., Campbell, G. L., and Bigner, D. D. (1985) Influence of glutamine on the growth of human glioma and medulloblastoma in culture, *Cancer Res.*, **45**, 4077-4081.
37. Lengauer, F., Geisslinger, F., Gabriel, A., Von Schwarzenberg, K., Vollmar, A. M., et al. (2023) A metabolic shift toward glycolysis enables cancer cells to maintain survival upon concomitant glutamine deprivation and V-AT-Pase inhibition, *Front. Nutr.*, **10**, 1124678, <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1124678>.
38. Blacker, T. S., and Duchon, M. R. (2016) Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence, *Free Radic. Biol. Med.*, **100**, 53-65, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.010>.
39. Kolenc, O. I., and Quinn, K. P. (2019) Evaluating cell metabolism through autofluorescence imaging of NAD(P)H and FAD, *Antioxid. Redox Signal.*, **30**, 875-889, <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7451>.
40. Skala, M. C., Ricking, K. M., Bird, D. K., Gendron-Fitzpatrick, A., Eickhoff, J., Eliceiri, K. W., Keely, P. J., and Ramanujam, N. (2007) *In vivo* multiphoton fluorescence lifetime imaging of protein-bound and free nicotinamide adenine dinucleotide in normal and precancerous epithelia, *J. Biomed. Optics*, **12**, 024014, <https://doi.org/10.1117/1.2717503>.
41. Song, A., Zhao, N., Hilpert, D. C., Perry, C., Baur, J. A., et al. (2024) Visualizing subcellular changes in the NAD(H) pool size versus redox state using fluorescence lifetime imaging microscopy of NADH, *Commun. Biol.*, **7**, 428, <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06123-7>.
42. Kim, J. H., Lee, J., Im, S. S., Kim, B., Kim, E.-Y., et al. (2024) Glutamine-mediated epigenetic regulation of cFLIP underlies resistance to TRAIL in pancreatic cancer, *Exp. Mol. Med.*, **56**, 1013-1026, <https://doi.org/10.1038/s12276-024-01231-0>.
43. Li, P., Zhou, C., Xu, L., and Xiao, H. (2013) Hypoxia enhances stemness of cancer stem cells in glioblastoma: an *in vitro* study, *Int. J. Med. Sci.*, **10**, 399-407, <https://doi.org/10.7150/ijms.5407>.
44. Larionova, T. D., Bastola, S., Aksinina, T. E., Anufrieva, K. S., Wang, J., et al. (2022) Alternative RNA splicing modulates ribosomal composition and determines the spatial phenotype of glioblastoma cells, *Nat. Cell Biol.*, **24**, 1541-1557, <https://doi.org/10.1038/s41556-022-00994-w>.
45. Najafi, M., Farhood, B., and Mortezaee, K. (2019) Cancer stem cells (CSCs) in cancer progression and therapy, *J. Cell. Physiol.*, **234**, 8381-8395, <https://doi.org/10.1002/jcp.27740>.
46. Li, B., Cao, Y., Meng, G., Qian, L., Xu, T., et al. (2019) Targeting glutaminase 1 attenuates stemness properties in hepatocellular carcinoma by increasing reactive oxygen species and suppressing Wnt/beta-catenin pathway, *EBioMedicine*, **39**, 239-254, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.11.063>.
47. Li, D., Fu, Z., Chen, R., Zhao, X., Zhou, Y., et al. (2015) Inhibition of glutamine metabolism counteracts pancreatic cancer stem cell features and sensitizes cells to radiotherapy, *Oncotarget*, **6**, 31151-31163, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5150>.
48. Prasad, P., Ghosh, S., and Roy, S. S. (2021) Glutamine deficiency promotes stemness and chemoresistance in tumor cells through DRP1-induced mitochondrial fragmentation, *Cell. Mol. Life Sci.*, **78**, 4821-4845, <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03818-6>.

49. Tardito, S., Oudin, A., Ahmed, S. U., Fack, F., Keunen, O., et al. (2015) Glutamine synthetase activity fuels nucleotide biosynthesis and supports growth of glutamine-restricted glioblastoma, *Nat. Cell Biol.*, **17**, 1556-1568, <https://doi.org/10.1038/ncb3272>.
50. Wang, L., Han, Y., Gu, Z., Han, M., Hu, C., et al. (2023) Boosting the therapy of glutamine-addiction glioblastoma by combining glutamine metabolism therapy with photo-enhanced chemodynamic therapy, *Biomater. Sci.*, **11**, 6252-6266, <https://doi.org/10.1039/D3BM00897E>.
51. Wang, Q., Wu, M., Li, H., Rao, X., Ao, L., et al. (2022) Therapeutic targeting of glutamate dehydrogenase 1 that links metabolic reprogramming and Snail-mediated epithelial-mesenchymal transition in drug-resistant lung cancer, *Pharmacol. Res.*, **185**, 106490, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106490>.
52. Ezoe, S., Matsumura, I., Satoh, Y., Tanaka, H., and Kanakura, Y. (2004) Cell cycle regulation in hematopoietic stem/progenitor cells, *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, **3**, 314-318.
53. Wei, Y., Chen, Q., Huang, S., Liu, Y., Li, Y., et al. (2022) The interaction between DNMT1 and high-mannose CD133 maintains the slow-cycling state and tumorigenic potential of glioma stem cell, *Adv. Sci.*, **9**, 2202216, <https://doi.org/10.1002/adv.202202216>.
54. Ishii, N., Maier, D., Merlo, A., Tada, M., Sawamura, Y., et al. (1999) Frequent co-alterations of *TP53*, *p16/CDKN2A*, *p14^{ARF}*, *PTEN* tumor suppressor genes in human glioma cell lines, *Brain Pathol.*, **9**, 469-479, <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1999.tb00536.x>.
55. Wanet, A., Arnould, T., Najimi, M., and Renard, P. (2015) Connecting mitochondria, metabolism, and stem cell fate, *Stem Cells Dev.*, **24**, 1957-1971, <https://doi.org/10.1089/scd.2015.0117>.
56. Pattappa, G., Heywood, H. K., De Bruijn, J. D., and Lee, D. A. (2011) The metabolism of human mesenchymal stem cells during proliferation and differentiation, *J. Cell. Physiol.*, **226**, 2562-2570, <https://doi.org/10.1002/jcp.22605>.
57. Rodimova, S. A., Meleshina, A. V., Kalabusheva, E. P., Dashinimaev, E. B., Reunov, D. G., et al. (2019) Metabolic activity and intracellular pH in induced pluripotent stem cells differentiating in dermal and epidermal directions, *Methods Appl. Fluores.*, **7**, 044002, <https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab3b3d>.
58. Rodimova, S., Mozherov, A., Elagin, V., Karabut, M., Shchechkin, I., et al. (2023) FLIM imaging revealed spontaneous osteogenic differentiation of stem cells on gradient pore size tissue-engineered constructs, *Stem Cell Res. Ther.*, **14**, 81, <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03307-6>.
59. Morelli, M., Lessi, F., Barachini, S., Liotti, R., Montemurro, N., et al. (2022) Metabolic-imaging of human glioblastoma live tumors: a new precision-medicine approach to predict tumor treatment response early, *Front. Oncol.*, **12**, 969812, <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.969812>.
60. Yuzhakova, D. V., Sachkova, D. A., Shirmanova, M. V., Mozherov, A. M., Izosimova, A. V., et al. (2023) Measurement of patient-derived glioblastoma cell response to temozolomide using fluorescence lifetime imaging of NAD(P)H, *Pharmaceuticals*, **16**, 796, <https://doi.org/10.3390/ph16060796>.
61. Kim, J. H., Lee, K. J., Seo, Y., Kwon, J.-H., Yoon, J. P., et al. (2018) Effects of metformin on colorectal cancer stem cells depend on alterations in glutamine metabolism, *Sci. Rep.*, **8**, 409, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18762-4>.
62. Valter, K., Chen, L., Kruspig, B., Maximchik, P., Cui, H., et al. (2017) Contrasting effects of glutamine deprivation on apoptosis induced by conventionally used anticancer drugs, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1864**, 498-506, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.12.016>.
63. Siegmund, D., Lang, I., and Wajant, H. (2017) Cell death-independent activities of the death receptors CD 95, TRAILR 1, and TRAILR 2, *FEBS J.*, **284**, 1131-1159, <https://doi.org/10.1111/febs.13968>.
64. Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., et al. (2018) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018, *Cell Death Differ.*, **25**, 486-541, <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>.
65. Dilshara, M. G., Jeong, J.-W., Prasad Tharanga Jayasooriya, R. G., Neelaka Molagoda, I. M., Lee, S., et al. (2017) Glutamine deprivation sensitizes human breast cancer MDA-MB-231 cells to TRAIL-mediated apoptosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **485**, 440-445, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.02.059>.
66. Fumarola, C., Zerbini, A., and Guidotti, G. G. (2001) Glutamine deprivation-mediated cell shrinkage induces ligand-independent CD95 receptor signaling and apoptosis, *Cell Death Differ.*, **8**, 1004-1013, <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400902>.
67. Mauro-Lizcano, M., and López-Rivas, A. (2018) Glutamine metabolism regulates FLIP expression and sensitivity to TRAIL in triple-negative breast cancer cells, *Cell Death Dis.*, **9**, 205, <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0263-0>.
68. Wang, B., Pei, J., Xu, S., Liu, J., and Yu, J. (2024) A glutamine tug-of-war between cancer and immune cells: recent advances in unraveling the ongoing battle, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **43**, 74, <https://doi.org/10.1186/s13046-024-02994-0>.
69. Lucena-Cacace, A., Otero-Albiol, D., Jiménez-García, M. P., Peinado-Serrano, J., and Carnero, A. (2017) NAMPT overexpression induces cancer stemness and defines a novel tumor signature for glioma prognosis, *Oncotarget*, **8**, 99514-99530, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20577>.

70. Hasan Bou Issa, L., Fléchon, L., Laine, W., Ouelkdite, A., Gaggero, S., et al. (2024) MYC dependency in GLS1 and NAMPT is a therapeutic vulnerability in multiple myeloma, *iScience*, **27**, 109417, <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.109417>.
71. Thongon, N., Zucal, C., D'Agostino, V. G., Tebaldi, T., Ravera, S., et al. (2018) Cancer cell metabolic plasticity allows resistance to NAMPT inhibition but invariably induces dependence on LDHA, *Cancer Metab.*, **6**, 1, <https://doi.org/10.1186/s40170-018-0174-7>.

GLIOBLASTOMA SENSITIZATION TO THERAPEUTIC EFFECTS BY GLUTAMINE DEPRIVATION DEPENDS ON CELLULAR PHENOTYPE AND METABOLISM

A. A. Isakova^{1,2}, I. N. Druzhkova³, A. M. Mozherov³, D. V. Mazur¹, N. V. Antipova¹, K. S. Krasnov⁴, R. S. Fadeev⁴, M. E. Gasparian¹, and A. V. Yagolovich^{2*}

¹ Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: annevayagolovich@gmail.com

³ Privolzhsky Research Medical University, 603081 Nizhny Novgorod, Russia

⁴ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

Glutamine plays an important role in tumor metabolism. It is known that the core region of the solid tumors is deprived of glutamine which affects tumor growth and spread. Here we investigated the effect of glutamine deprivation on cellular metabolism and sensitivity of human glioblastoma cells U87MG and T98G to drugs of various origin: alkylating cytostatic agent temozolomide; cytokine TRAIL DR5-B – agonist of the DR5 receptor; and GMX1778 – a targeted inhibitor of the enzyme nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT), limiting NAD biosynthesis. Bioinformatics analysis of the cell transcriptomes showed that U87MG cells have a more differentiated phenotype than T98G, and also differ in the expression profile of genes associated with glutamine metabolism. Upon glutamine deprivation, the growth rate of U87MG and T98G cells decreased. Analysis of cellular metabolism by FLIM microscopy of NADH as well as assessment of the lactate content in the medium showed that glutamine deprivation shifted the metabolic status of U87MG cells towards glycolysis. This was accompanied by an increase in the expression of the stemness marker CD133, which collectively may indicate the de-differentiation of these cells. At the same time, we observed an increase in both the expression of DR5 receptor and the sensitivity of U87MG cells to DR5-B. On the contrary, glutamine deprivation of T98G cells induced a metabolic shift towards oxidative phosphorylation, a decrease in DR5 expression and resistance to DR5-B. The effects of NAMPT inhibition also differed across two cell lines and were opposite to those of DR5-B: upon glutamine deprivation, U87MG cells acquired resistance, while T98G cells were sensitized to GMX1778. Thus, phenotypic and metabolic differences between two human glioblastoma cell lines resulted in divergent metabolic changes and contrasting responses to different targeted drugs during glutamine deprivation. These data should be considered when developing treatment strategies for glioblastoma via drug deprivation of amino acids, as well as when exploring novel therapeutic targets.

Keywords: glutamine deprivation, glioblastoma, cell differentiation, CD133, TRAIL, DR5, NAD(P)H, FLIM microscopy, NAMPT, GMX1778