

Az mTOR aktivitás és a metabolikus változások kapcsolatának vizsgálata *in vitro* tumormodelleken

Doktori értekezés

Dr. Hujber Zoltán

Semmelweis Egyetem
Patológiai tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Sebestyén Anna, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Komlósi Zsolt, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Péterfia Bálint Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Buzás Edit Irén, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tóth Erika, Ph.D., osztályvezető főorvos
Dr. Tőkés Anna-Mária Ph.D., tudományos főmunkatárs

Budapest
2018

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
1. BEVEZETÉS	8
1.1. Metabolikus változások daganatbiológiai jelentősége	8
1.2. Irodalmi háttér összefoglalása	9
1.2.1. A malignus fenotípus, a daganat jellemzői	9
1.2.2. A daganatsejtekre jellemző általános anyagcsere-változások.....	10
1.2.3. Warburg-effektus – aerob glikolízis	11
1.2.4. Tejsav mint onkometabolit.....	14
1.2.5. Citromsavciklus, oxidatív foszforiláció szerepe a daganatok anyagcseréjében	16
1.2.6. Glutaminolízis	18
1.3. Onkometabolit-termeléssel összefüggő mutációk és anyagcsere-változások daganatokban.....	18
1.3.1. Az onkometabolitok fogalma	18
1.3.2. Onkometabolit-termeléssel összefüggő anyagcsereenzim mutációk.....	18
1.3.3. A leggyakoribb anyagcsereenzim mutációk és az azokkal összefüggő daganatos betegségek.....	19
1.3.3.1. Gliomák: szövettani besorolás, IDH mutáció, lehetséges bioenergetikai szubsztrátok	21
1.4. Metabolikus adaptáció és heterogenitás	25
1.5. Anyagcsere-folyamatok szabályozása	27
1.6. Metabolikus gátlók, a daganatsejtek anyagcseréjét befolyásoló hatóanyagok és célpontjaik	29
1.6.1. Glikolízis gátlók	29
1.6.2. Mitokondriális támadáspontú gátlószerek	30
1.6.3. Glutaminolízis gátlók	30
1.6.4. Egyéb gátlószerek	30
1.7. PI3K/AKT/mTOR jelátviteli útvonal.....	31
1.7.1. mTOR komplexek szerkezete és funkciói	33
1.7.2. mTOR és az anyagcsere-szabályozás kapcsolata tumorokban	35
1.7.3. mTOR gátlók.....	37
2. CÉLKITŰZÉSEK	40
3. MÓDSZEREK	41
3.1. Vizsgált <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> modellek és humán szövetek	41
3.1.1. Sejt- és szövettenyésztés – <i>in vitro</i> vizsgálatok	41
3.1.2. Kezelőszerek, inhibitorok, metabolitok és biológiai hatásaik vizsgálata.....	41
3.1.3. Proliferáció és apoptózis vizsgálata	42

3.1.4. Xenograft modell létrehozása HT-1080 fibrosarcoma sejtekkel – <i>in vivo</i> vizsgálatok	43
3.1.5. Szöveti multiblokk (TMA) készítése humán glioma biopsziás mintákból – <i>in situ</i> vizsgálatok.....	43
3.2. Expressziós és mutációs vizsgálatok.....	43
3.2.1. Western blot vizsgálatok	43
3.2.2. Immuncitokémiai és immunhisztokémiai vizsgálatok	44
3.2.3. IDH mutáció igazolása Sanger szekvenálással	45
3.3. Anyagcsere-folyamatok vizsgálatai	46
3.3.1. Tumorsejtek szubsztrát oxidációjának vizsgálata ¹⁴ C-jelzett acetát és glükóz tápanyaggal	46
3.3.2. Metabolitok extrakciója, majd mennyiségük meghatározása tömegspektrometriai módszerekkel	47
3.3.3. Szubsztrát hasznosítás vizsgálata LC-MS-sel ¹³ C stabil izotópjelölés után .	48
3.3.4. Oxigénfogyasztás és extracelluláris acidifikáció mérése Seahorse technikával	48
3.4. Statisztikai analízis.....	49
4. EREDMÉNYEK.....	50
4.1. Bioenergetikai vizsgálatok <i>in vitro</i> sejtvonalakban	50
4.1.1. Különböző tumor sejtvonalak ¹⁴ C-glükóz és -acetát szubsztrát hasznosításának jellemzése	50
4.1.2. Bioenergetikai útvonalakban fontos enzimek, transzporterek expressziójának jellemzése.....	51
4.1.3. Glükóz hasznosítás vizsgálata ¹³ C-jelölt glükóz jelölést követő LC-MS méréssel.....	52
4.1.4. Citrátkör működésének vizsgálata ¹³ C-jelölt acetáttal	53
4.1.5. Glükóz és acetát szubsztrát hatása az adenilát energiatöltésre.....	53
4.1.6. A vizsgált bioenergetikai útvonalak lehetséges szabályozói	55
4.2. 2-hidroxi-glutarát termelés és az mTOR aktivitás kapcsolata.....	56
4.2.1. HT-1080 fibrosarcoma sejtek 2-hidroxi-glutarát onkometabolit-termelése... 56	
4.2.2. Rapamycin mTOR aktivitás gátló hatásai (proliferációs és fehérje szintű vizsgálatok) HT-1080 sejtekben	58
4.2.3. Rapamycin kezelés, az mTORC1 aktivitás laktát és 2-HG onkometabolit-termelést befolyásoló hatása	59
4.2.4. mTORC1 aktivitás 2-HG és laktát onkometabolit-termelést csökkentő hatásának háttere	61
4.2.5. Rapamycin <i>in vivo</i> hatásai HT-1080 xenograft modellben (tumornövekedés, szöveti laktát és 2-HG mennyiségek vizsgálata).....	63
4.3. Glioma sejtvonalak bioenergetikai tulajdonságainak vizsgálata az IDH1 vad és mutáns sejtvonalak összehasonlítása.....	64
4.3.1. Glioma sejtvonalak alaplégzésében, glikolitikus aktivitásában kimutatható különbségek	64

4.3.2. Az IDH1 mutáns sejtekben, a 2-HG termeléssel párhuzamosan a sejtek alaplégzése magasabb, míg a glikolitikus kapacitása csökkent	66
4.3.3. Intracelluláris metabolit koncentrációk és a 2-hidroxioglutarát forrásának vizsgálata IDH1 wt illetve mutáns gliomasejtekben.....	69
4.3.4. Az IDH1 mutáció, az intracelluláris 2-HG és a bioenergetikai szubsztrátok oxidációjában kimutatható különbségek összefüggései U251 glioma sejtekben	72
4.3.5. Rövid és hosszú távú GABA kezelés proliferációs hatása vad és IDH1 mutáns U251 sejtekben	74
4.4. SSADH expresszió vizsgálata humán biopsziás glioma mintákon.....	75
5. MEGBESZÉLÉS	77
5.1. Bioenergetikai folyamatok vizsgálatára alkalmas <i>in vitro</i> módszerek.....	77
5.2. Az mTOR jelút aktivitásának szerepe a bioenergetikai folyamatok szabályozásában	79
5.3. Az mTORC1 gátló rapamycin kezelés csökkenti a laktát és a 2-HG termelést IDH1 mutáns HT-1080 sejtekben <i>in vitro</i> és <i>in vivo</i>	80
5.4. Gliomákra jellemző alaplégzés, glikolízis, szubsztrát oxidáció és GABA anyagcsere az IDH1 mutációval összefüggésben.....	83
6. KÖVETKEZTETÉSEK.....	88
7. ÖSSZEFOGLALÁS	90
8. SUMMARY	91
9. IRODALOMJEGYZÉK	92
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	111
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	113

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2-HG: D-2-hidroxioglutarát

4EBP1: 4E kötő fehérje 1

ABC: avidin biotin complex

ACSS2: acetyl-CoA szintetáz 2

ADP: adenzin-difoszfát

AEC: adenilát energia töltés (adenylate energy charge)

aKG: α -ketoglutarát

AKT: v-akt egér thymoma virális onkogén homológ; szerin/treonin kináz

AML: akut myeloid leukaemia

AMP: adenzin-monofoszfát

AMPK: adenzin-monofoszfát-aktiválta kináz

ASCT2: alanine, serine, cysteine preferring transzporter 2; glutamin transzporter

ATCC: American Type Tissue Culture

ATG: autofágia-kapcsolt gén

ATP: adenzin-trifoszfát

ATPB: β -F1-ATPáz

ATRX: X-kromoszómához kapcsolt alfa-talasszémiamentális retardáció

BPTES: bisz-2-(5-fenilacetamido-1,3,4-tiadiazol-2-il) etil szulfid

c-MYC: celluláris myelocytomatosis onkogén

CT: komputertomográf

DAB: 3,3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorid

DEPTOR: DEP domain containing mTOR-interacting protein

DNS: dezoxiribonukleinsav

ECL: erősített kemilumineszencia

ECAR: extracellular acidification rate (extracelluláris acidifikációs ráta)

ECM: extracelluláris mátrix

EGFR: epidermális növekedési faktor receptor

FH: fumarát-hidratáz

G6PDH: glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz

GAPDH: glicerín-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz

GABA: gamma-aminobutyric acid (gamma-amino-vajsav)

GAC: glutaminase C
GAT1: GABA transzporter 1
Gls: glutamináz
FADH₂: redukált flavin-adenin-dinukleotid
FAT: FRAP–ATM–TRRAP domén
FATC: C-terminuson elhelyezkedő FAT domén
FBS: főtális borjú savó
FDG-PET: fluoro-deoxiglükóz pozitron emissziós tomográfia
FKBP-12: 12 kDa molekulásúlyú FK506-ot kötő fehérje
FRAP: FKBP-rapamycin-asszociált fehérje
FRB: FK506-rapamycin kötő domén
GAPDH: glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GLUT1: glükóz transzporter1 fehérje
HEAT: Huntington, elongációs faktor 3, PR65/A
HIF1 α : hypoxia indukálta faktor 1 α transzkripció faktor
HK2: hexokináz 2
HRP: tormaperoxidáz (horse radish peroxidase)
ICC: intrahepatikus cholangiocarcinoma
IDH: izocitrát-dehidrogenáz
IDH1m: izocitrát-dehidrogenáz 1 mutáció
IGF: inzulinszerű növekedési faktor
IGFR: inzulinszerű növekedési faktor receptor
IHC: immunhisztokémia
IL: interleukin
KGA: kidney type glutaminase
LC-MS: folyadék kromatográfia-tömegspektrometria (liquid chromatography - mass spectrometry)
LDH-A: laktát-dehidrogenáz A
LDH-B: laktát-dehidrogenáz B
mLST8: mammalian lethal with SEC13 protein 8
MRM: multiple reaction monitoring
mSin1: mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1

mTOR: mammalian target of rapamycin
mTORC1: mTOR komplex 1
mTORC2: mTOR komplex 2
NAD⁺: oxidált nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADH: redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADPH: redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NADP⁺: oxidált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NFκB: nukleáris faktor κ B
NOBA: 3-nitrobenzil alkohol
OAC: oxálacetát
OCR: oxygen consumption rate (oxigén fogyasztási ráta)
PCR: polimeráz láncreakció
PDK: piruvát-dehidrogenáz kináz
PDK1: foszfatidil-inozitol dependens kináz 1
PET: pozitron emissziós tomográfia
PFKP: foszfofruktokináz P
PI3K: foszfatidil-inozitol-3-kináz
PKC: protein kináz C
PKM2: piruvát-kináz M2 izoforma
PRAS40: proline-rich AKT substrate of 40 kDa
Protor1/2: protein observed with rictor 1 and 2
p-S6: foszforilált riboszómális S6 fehérje
PTEN: tensin homolog deleted on chromosome 10
PVDF: polivinilidén fluorid
Raptor: regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin
RHEB: Ras homolog enriched in the brain
Rictor: rapamycin-insensitive companion of mTOR
RNS: ribonukleinsav
RT-PCR: reverz transzkripció-polimeráz láncreakció
S6K: riboszómális S6 kináz
SDS: nátrium-dodecilszulfát
SDH: szukcinát-dehidrogenáz

SGK1: szérum-, glükokortikoid indukált proteon kináz 1

SREBP: sterol regulatory element-binding protein 1

SSADH: szukcinát szemialdehid-dehidrogenáz

TCA: tricarboxylic acid

TMA: tissue microarray

TMS: trimetilklórszilán

TSC1/2: tuberous sclerosis complex 1/2

ULK1: uncoordinated 51-like kinase 1

VEGF: vaszkuláris növekedési factor

WHO: World Health Organization

1. BEVEZETÉS

1.1. Metabolikus változások daganatbiológiai jelentősége

A legújabb daganatbiológiai vizsgálatok a tumorsejtek megváltozott, a proliferációjukhoz szükséges bioenergetikai háttérrel biztosító anyagcsere-folyamatainak jelentőségét hangsúlyozzák nemcsak a daganatok progressziójában és a terápiás érzékenység változásaiban, hanem akár a daganatok kialakulásában is. Számos adat támasztja alá, hogy a tumorsejtek a normál sejtektől eltérő anyagcsere-jellegzetességekkel (metabolikus tulajdonságokkal/profillal), tápanyagigénnyel és szubsztrát hasznosító képességgel (pl. glikolízis, glutaminolízis, zsírsav oxidáció) rendelkeznek. Előbbiekkel párhuzamosan a daganatsejtekre jellemző lehet a nagyfokú metabolikus alkalmazkodóképesség, ami hozzájárulhat a daganatsejtek hosszú távú, akár terápiás kezelés melletti túléléséhez, majd terjedéséhez, áttétképzéséhez is. Fontos az előbbieket befolyásoló tényező a daganatszövet heterogenitása is, amely a daganat genetikai sokfélesége (eltérő tumorsejtklónok) mellett jelenti a daganat és mikrokozonyete (normál parenchyma sejtek, stroma- és immunsejtek) együttműködését, szimbiózisát, az adott mikrokozonyethez alkalmazkodását is. A szövetalkotó sejtek metabolikus szimbiózisa, metabolikus heterogenitása segítheti a daganatsejtek túlélését és alkalmazkodását a terápiás szerekhez, így hozzájárulhat a kezeléssel szembeni rezisztenciához. A metabolikus változás során a daganatsejtek nagy mennyiségben kis molekulákat, onkometabolitokat is termelnek, melyek a malignus fenotípust számos ponton támogatják. A legismertebb onkometabolitok a szukcinát, fumarát vagy a 2-hidroxiglutarát (2-HG), de a legújabb összefoglalók már a daganatsejtekben felhalmozott laktátot is onkometabolitnak tekintik.

A tumorsejtek anyagcseréjének szabályozásában genetikai és epigenetikai tényezők játszanak szerepet. A tumorigenikus változások (onkogén aktiváció vagy tumorszuppresszor inaktiváció) a tumor növekedésben fontos szerepet játszó jelátviteli útvonalak mellett részt vesznek az anyagcsere-szabályozás átprogramozásában is. Az RTK-PI3K-mTOR tengely számos sejtfunkció szabályozásában alapvető. Ennek egyik központi eleme az mTOR (mammalian target of rapamycin) kináz két eltérő komplex (C1 és C2) formájában lehet jelen a sejtekben, melyek a jelátviteli hálózat fontos szabályozó elemeiként szenzorai a sejtek energia- és tápanyag-ellátottságának, aminek

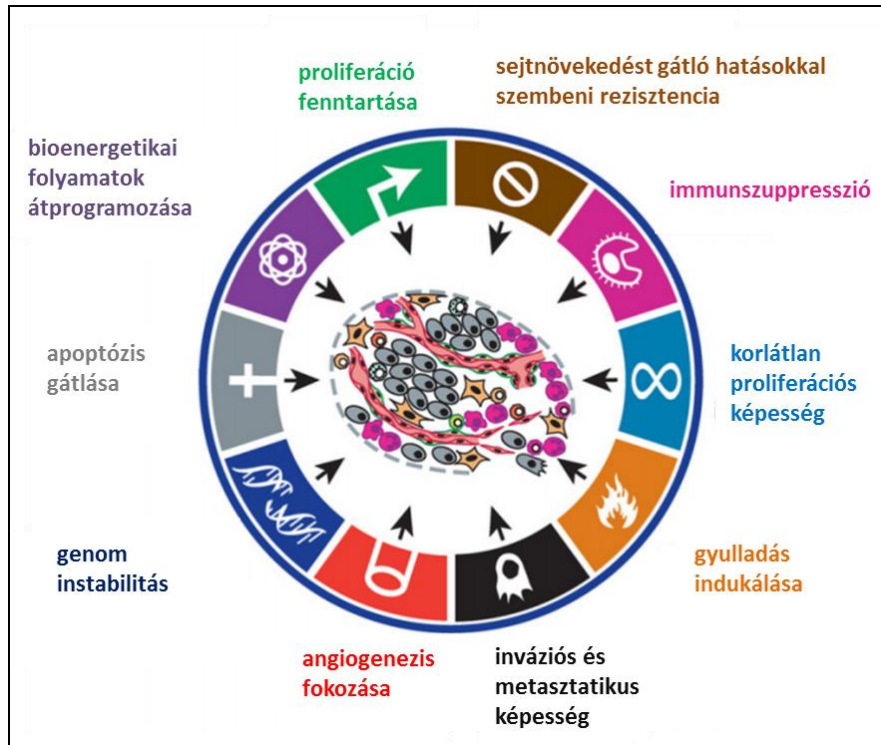
függvényében szabályozzák a sejtek túlélését, proliferációját, az új sejtek felépítéséhez szükséges építőelemek bioszintetikus vagy akár lebontó folyamatait.

Munkámban daganatsejtek metabolikus profiljának jellemzéséhez különböző módszereket kerestem és állítottam be. Előbbiekkel összefüggő anyagcsere-folyamatokat és szabályozó folyamatokat vizsgáltam. Tanulmányoztam a különböző daganatsejtek normálistól eltérő, jellemzően fokozott glikolitikus aktivitását, az izocitrát-dehidrogenáz mutáció következményeként felhalmozódó 2-hidroxi-glutarát onkometabolit-termelés hatásait, a daganatsejtek szubsztrát hasznosításának különbségeit és ezek összefüggését az emelkedett mTOR aktivitással.

1.2. Irodalmi háttér összefoglalása

1.2.1. A malignus fenotípus, a daganat jellemzői

Hanahan és Weinberg először 2000-ben foglalta össze a tumorsejtek alapvető jellegzetességeit. A szerzők hat olyan tulajdonságot soroltak fel, amely a malignus sejteket a normál sejtektől megkülönbözteti: korlátlan proliferációs képesség, folyamatos növekedés biztosítása növekedési szignálokkal (proliferáció fenntartása), sejtnövekedést gátló hatásokkal szembeni rezisztencia, apoptózis – programozott sejthalál – gátoltsága, inváziós és metasztatikus képesség, a szövet növekedéséhez szükséges angiogenezis fokozása [1]. 2011-ben további jellemzők kerültek az előbbieket mellé: a daganatos szövet gyulladási folyamatai, illetve a daganatsejtek immunszuppresszív hatásai, genom instabilitása, valamint anyagcsere-változásai, a bioenergetikai folyamataik átprogramozása (**1. ábra**) [2]. Ezt követően az elmúlt években a daganatimmunológia, a genetikai változások feltárása és az onkogén hatásokkal párhuzamosan megjelenő megváltozott anyagcsere-folyamatok jellemzése is széles körben kutatott területté vált [3].



1. ábra. Tumorsejtek legfontosabb tulajdonságai Hanahan és Weinberg (2011) szerint [2]. Hanahan és Weinberg 2000-ben összefoglalták a malignus sejtekre jellemző tulajdonságokat: korlátlan proliferációs képesség, sejtnövekedést gátló hatásokkal szembeni rezisztencia, apoptózis gátlása, proliferáció fenntartása, angiogenezis fokozása, inváziós és metasztatikus képesség. 2011-es közleményükben további jellemzőkkel egészítették ki az előző listát: daganatok által okozott immunszuppresszió, gyulladásindukció, daganatsejtek genom instabilitása és a bioenergetikai folyamatok átprogramozottsága.

1.2.2. A daganatsejtekre jellemző általános anyagcsere-változások

A különböző bioenergetikai útvonalak szubsztrátjai, a glükóz, a glutamin, a tejsav, a piruvát, a β -hidroxibutirát, az acetoacetát, az acetát és a szabad zsírsavak felhasználása segíti a tumorsejtek proliferációját. Előbbi szubsztrátokból a tumorsejtek arányaikban lényegesen többet hasznosítanak, mint a normál sejtek, folyamatos osztódásukhoz különböző katabolikus folyamatok biztosítják a szükséges energiát (ATP-t). A sejtproliferációhoz szükséges energiatermelésben kiemelkedő szerepet tölt be a glikolízis, de a glükóz hasznosítása mellett más források is fontos szerepet játszhatnak, például a tejsav oxidáció (reverz Warburg-effektus), a glutamin hasznosítás, vagy

makromolekulák (lipidek, fehérjék) lebontása [3-5]. Az, hogy mely szubsztrátok milyen útvonalú hasznosítását részesíti előnyben az adott daganatsejt számos tényezőtől függ. Például a mikrokörnyezet, tápanyag-ellátottság, onkogén driver mutációk és epigenetikai hatások is jelentős mértékben befolyásolják a metabolikus folyamatok átrendezését [6, 7]. A tumorsejtek vagy akár az egész tumorszövet anyagcsere-folyamatait módosíthatják az ún. onkometabolitok, amelyek olyan nagy mennyiségben termelődő kis molekulák, melyek többféle úton támogathatják a daganatok progresszióját. Onkometabolit például az izocitrát-dehidrogenáz enzim mutációjának következtében termelődő 2-hidroxioglutarát, a szukcinát-dehidrogenáz mutáció termékeként képződő szukcinát vagy a fumarát-hidratáz enzim mutációja hatására nagy mennyiségben termelődő fumarát is [8, 9]. Az onkometabolitok közé sorolják ma már a Warburg-effektus végtermékeként keletkező nagy mennyiségű tejsavat is, amelynek extracelluláris és intracelluláris megjelenése befolyásolhatja a sejt anyagcsere-folyamatait, a különböző jelátviteli útvonalak aktivitását, de akár a tumorsejt mikrokörnyezetét is. Utóbbiak összessége elősegíti a daganat növekedését, a daganatsejtek metasztázisát is [10].

Az aktiválódott onkogének, inaktiválódott tumorszuppresszor gének, a sejtfunkciók szabályozásban szerepet játszó jelátviteli útvonalak (pl. a későbbiekben tárgyalt PI3K/AKT/mTOR útvonal) elemei és egyéb fehérjék aktivitás változása mellett az anyagcsere-változások összessége is jelentős mértékben módosíthatja a daganatok növekedésének *in vivo* szabályozását, így is segítve a daganatszövet rendkívüli alkalmazkodóképességét [6, 7, 11].

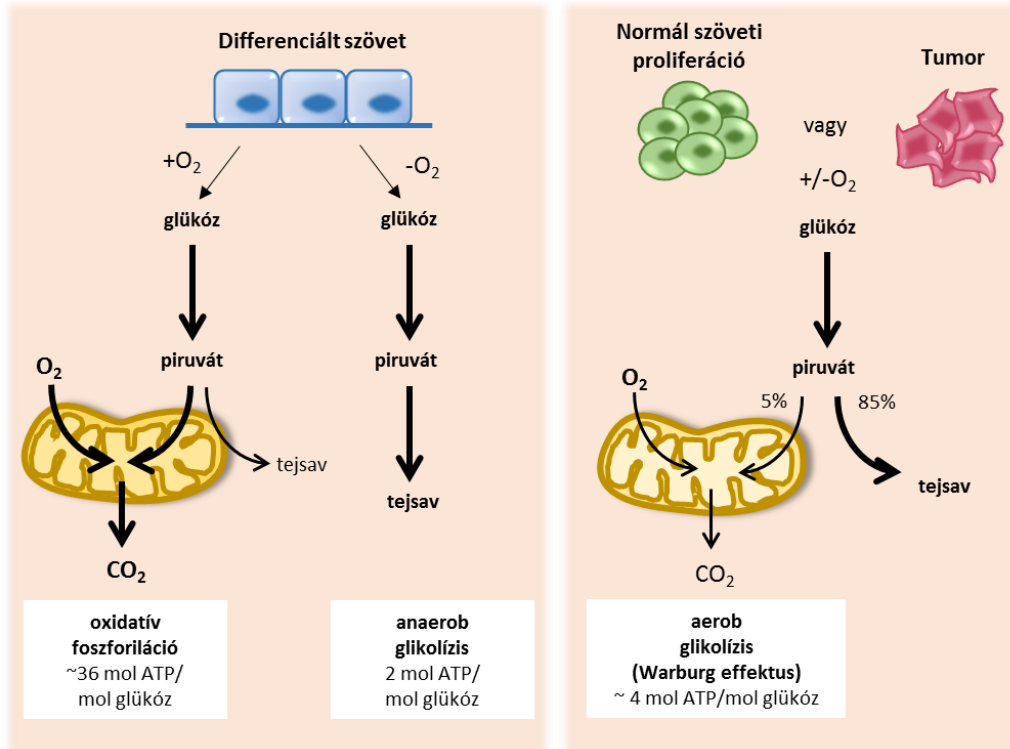
1.2.3. Warburg-effektus – aerob glikolízis

Otto Warburg már az 1920-as évek elején felismerte a daganatsejtek anyagcsere-változását és ennek jelentőségét. A daganatok többségére jellemző az oxigén-ellátottságtól független, fokozott mértékű glikolízis és tejsavtermelés, ezt Warburg-effektusnak nevezzük. Warburg a jelenséget a mitokondrium károsodott funkcióival magyarázta és a daganatos megbetegedés eredetének tartotta [12, 13]. A későbbiekben kiderült, hogy a károsodott mitokondriumok jelenléte azonban csak a tumorok kisebb százalékára jellemző [6]. Jelenleg a tumorszuppresszorok és/vagy onkogének mutációit tekintik a daganatok képződését előidéző legfontosabb tényezőnek, a tumorok nagy

részére jellemző Warburg-effektust pedig, inkább következménynek. Warburg elméletét nem sokkal később Herbert Crabtree egészítette ki, amikor felfedezte, hogy bizonyos daganatsejtek könnyen tudnak alkalmazkodni a megváltozott tápanyag-ellátottsághoz: képesek aerob glikolízisről oxidatív foszforilációra váltani és fordítva. Ezt a jelenséget Crabtree-effektusnak nevezzük [14, 15], aminek kiemelkedő szerepe lehet a metasztázis során megfigyelhető metabolikus alkalmazkodásban is [4, 16]. A 2000-es évek végétől a Warburg-effektus, a tumorok anyagcsere-változásainak vizsgálata újra előtérbe került, számos glikolízis gátlót fejlesztettek és teszteltek különböző daganatokon. 2008-ban Cantley és munkatársai kimutatták, hogy az intenzíven proliferáló daganatsejtekre jellemző a piruvát-kináz M2 izoforma (PKM2) fokozott expressziója, ami a glikolitikus eltolódással hozható összefüggésbe [17, 18]. Szintén ebben az időben jelent meg az irodalomban az onkometabolitok fogalma (2009), az anyagcsereenzimek mutációinak felismerésével kapcsolatban. Majd Hanahan és Weinberg 2011-ben a tumorsejtek megváltozott bioenergetikai folyamataival egészítette ki a daganatsejtek jellemzőit. A 2010-es évektől számos a malignus fenotípussal összefüggő jelenséget írtak le. [19].

A nem daganatos sejtekben megfelelő oxigénellátottság mellett a glükóz a glikolízisben piruváttá alakul, amely belépve a mitokondriumba acetyl-CoA-n keresztül a citromsavciklusban alakul tovább különböző intermedierekké [6]. A Krebs-ciklus reakcióiban szubsztrát-szintű foszforiláció mellett NADH képződik, ennek eredményeként az oxidatív foszforilációval glükóz molekulánként végül 36-38 molekula ATP keletkezik. A Warburg-effektus során a glükóz nagy része a glikolízisben, a tejsavtermelésben, míg kis része a glikolitikus átalakulások után mitokondriális oxidatív folyamatokban hasznosul. A Warburg-effektusban, a glikolízisben keletkező piruvát tejsavvá alakul, közben 2 molekula ATP keletkezik. A Warburg-fenotípusú tumorsejtben a glikolízis túlsúlya átlagosan 4 molekula ATP-t eredményez glükóz molekulánként (**2. ábra**) [18, 20, 21, 22]. Ez nem effektív ATP termelés. Az ATP szint azonban nem limitáló tényező a tumorsejtek növekedésében, a Warburg-effektus oxigén koncentrációtól függetlenül, hypoxia nélkül is felléphet [18]. Felmerül a kérdés, hogy mégis milyen előnye származhat a tumorsejteknek a Warburg-effektusból. A folyamatban a glikolitikus eltolódás fokozza a glikolitikus intermedierek felhalmozódását, ami kiindulási anyagokat nyújt különböző bioszintetikus útvonalakhoz az osztódó sejtekben. Az intermedierek közül például a ribóz-5-foszfátot a nukleinsav

szintézisben, a dihidroxi-aceton-foszfátot a foszfolipidek és trigliceridek szintézisében, a glükóz-6-foszfátot pedig glikogéntermelésben hasznosíthatja a sejt [4, 6, 23].



2. ábra. A differenciált, ill. az osztódó normál sejtek vagy tumorsejtek jellemző energiatermelő folyamatai (forrás: [18] alapján készített ábra). A differenciált szövetek oxigénellátottságtól függően bioenergetikai igényük kielégítésére a glükózt oxidatív foszforilációval (oxigén jelenlétében) vagy anaerob glikolízissel (oxigén hiányában) bontják le. Az osztódó sejtek, így a tumorsejtek a glükózt oxigénellátottságtól függetlenül aerob glikolízisben (Warburg-effektus) képesek hasznosítani – ezt előnyben részesítik más katabolikus folyamatokkal szemben.

A tumorsejtekben az aerob glikolízist támogatja a fokozott piruvát-kináz M2 (PKM2) izoenzim expresszió; az enzim aktivitása gyorsan változik attól függően, hogy tetramer (katabolikus folyamatok segítése) vagy dimer (anabolikus folyamatok segítése) forma alakul-e ki. A PKM2 dimer forma csökkent enzim aktivitása a tőle „upstream” található glikolítikus intermedierek felhalmozódását és bioszintetikus hasznosítását (nukleinsavak, lipidek, aminosavak szintézise) segíti elő [6, 17]. Ugyanakkor, azt is

igazolták többféle tumorsejtben, hogy ATP termelésük nagy részét sokszor nem az intenzív glikolízis biztosítja [24]. A sejtek bioenergetikai egyensúlyában fontos, hogy a piruvát-kináz szabályozási pont a glükóz milyen mértékű tejsavas glikolízisben vagy „teljes” oxidatív foszforilációban történő hasznosítását teszi lehetővé. Ennek a pontnak az egyensúlya és a TCA ciklus más szubsztrátokkal való feltöltése (TCA-anaplerózis) nagyfokú tápanyag hasznosítási, alkalmazkodási lehetőséget biztosít a tumorsejtek számára. Így a daganatsejtek egyedi jellegzetességeik, metabolikus alkalmazkodásuk függvényében a szükséges ATP-t a rendelkezésre álló szubsztrátokból a glikolízis és az oxidatív foszforiláció különböző %-os arányú működésével fent tudják tartani [24, 25].

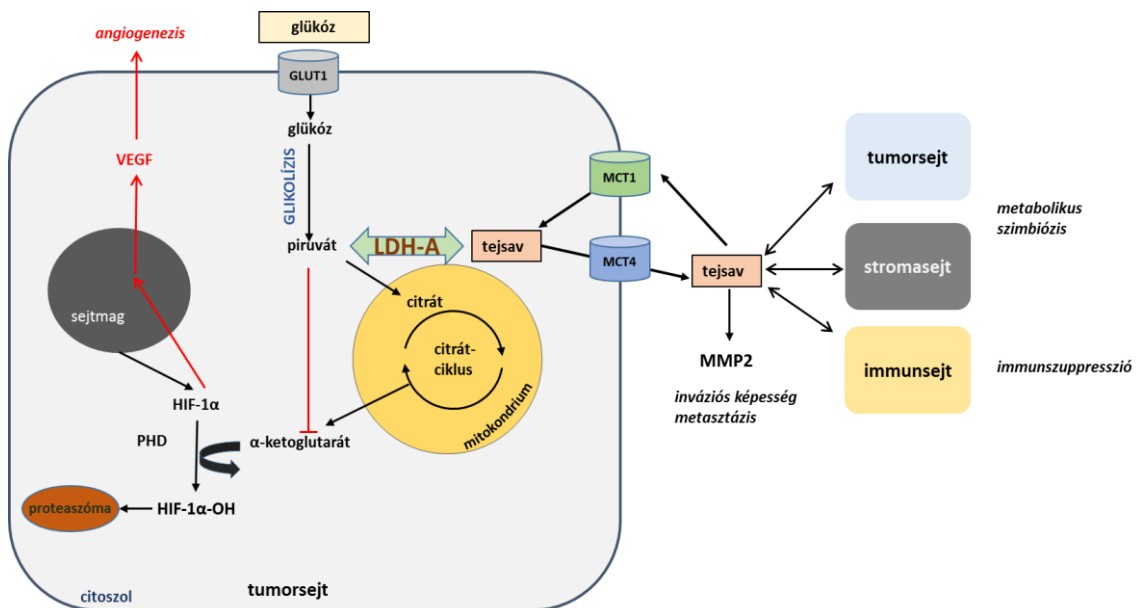
A jelenlegi kezelések fejlesztését nagyban segítik azok a vizsgálatok, amelyekben az adott daganat/daganatsejt alkalmazkodását, anyagcsere-változásait (metabolikus profilját) tanulmányozhatjuk a daganat heterogenitás és környezeti alkalmazkodás (pl. a terápiás hatások) függvényében.

1.2.4. Tejsav mint onkometabolit

A tumorsejtek többségére jellemző a nagy mennyiségű tejsavtermelés. A tejsav piruvátból laktát-dehidrogenáz A (LDH-A) segítségével képződik. Majd a tumorsejtek a tejsavat monokarboxilát transzporter 4 (MCT4) segítségével exportálják a környezetükbe, ez hatással van más mikrokörnyezeti sejtek működésére, pl. a tumor asszociált fibroblastokra, immuneffektor- vagy endotélsejtekre is [26, 27]. A tejsav az extracelluláris térben pH változást eredményez, az alacsony pH gátolja a tumorsejt ellenes immuneffektor sejtek (pl. citotoxikus T limfocita, NK sejtek) működését, valamint aktiválja a pH-függő mátrix metalloproteinázokat, katepszineket. Ebben a mikrokörnyezetben a hypoxia és a tejsavas mikrokörnyezet serkenti az angiogenezist, növekedési faktorok, így a VEGF termelés fokozásán keresztül is. Előbbiek a tejsav sokoldalú hatásaiból olyan példák, amelyek az extracelluláris mátrix átrendeződést, a tumor inváziót és metasztázis képzést befolyásolják [27, 28].

A mikrokörnyezetbe leadott laktát bioenergetikai úton is hasznosulhat; a stroma-sejtek monokarboxilát transzporterek (elsősorban MCT1) segítségével vehetik fel, majd reverz Warburg-effektus segítségével – piruváton – keresztül a citrátköri oxidatív folyamatokban energiát nyerhetnek belőle [29]. A laktátból keletkező piruvát nemcsak a stromasejtekben, hanem akár a tumorsejtek által is felhasználásra kerülhet. A

tumorsejtek és stromasejtek anyagcsere-folyamataikban keletkező intermedier termékek egymás közötti cseréjét és hasznosításának különböző lehetőségeit, továbbá ezek *in situ* megvalósulását, metabolikus szimbiózisnak nevezzük [28]. Ezekben a folyamatokban a laktát energiaszubsztrátként is viselkedhet aerob környezetben, amely hasznosításának gátlása csökkentheti a tumorsejtek alkalmazkodási (adaptációs) képességét [30, 31]. Előbbiek, a tejsav daganatnövekedést támogató hatásait bemutató példák is alátámasztják a tejsav onkometabolitok közé sorolását (3. ábra).



3. ábra. A tejsav lehetséges tumorbiológiai hatásai (forrás: [32] alapján készített ábra). A tejsav szerepet játszik a tumor növekedését és migrációját segítő mikroenvironmenti változásokban is, így az immunszuppresszív mikroenvironment kialakulásában vagy a tumorsejtek áttétképzésében (katepszinek, mátrix metalloproteázok aktiválása) és az angiogenezisben is (pl. a HIF-1 α stabilizációján keresztül VEGF termelés serkentésével). A tejsavat mint energia szubsztrátot is hasznosíthatják a tumorszövet legkülönbözőbb sejtjei: a mikroenvironmenti sejtek (pl. fibroblastok, immunsejtek vagy más oxidatív, reverz Warburg-effektusra képes tumorsejtek) vagy akár a heterogén tumorszövet egyes tumorsejtjei is – metabolikus szimbiózis. A tejsav az immunsejtekre gátló hatást fejt ki a mikroenvironmentben, továbbá a mátrix metalloproteináz-2 (MMP2) aktivitását fokozva segítheti a tumorsejtek invázióját. MCT: monokarboxilát transzporter, LDH-A: laktát-dehidrogenáz-A, GLUT1: glükóz transzporter 1, PHD: prolil-hidroxiláz.

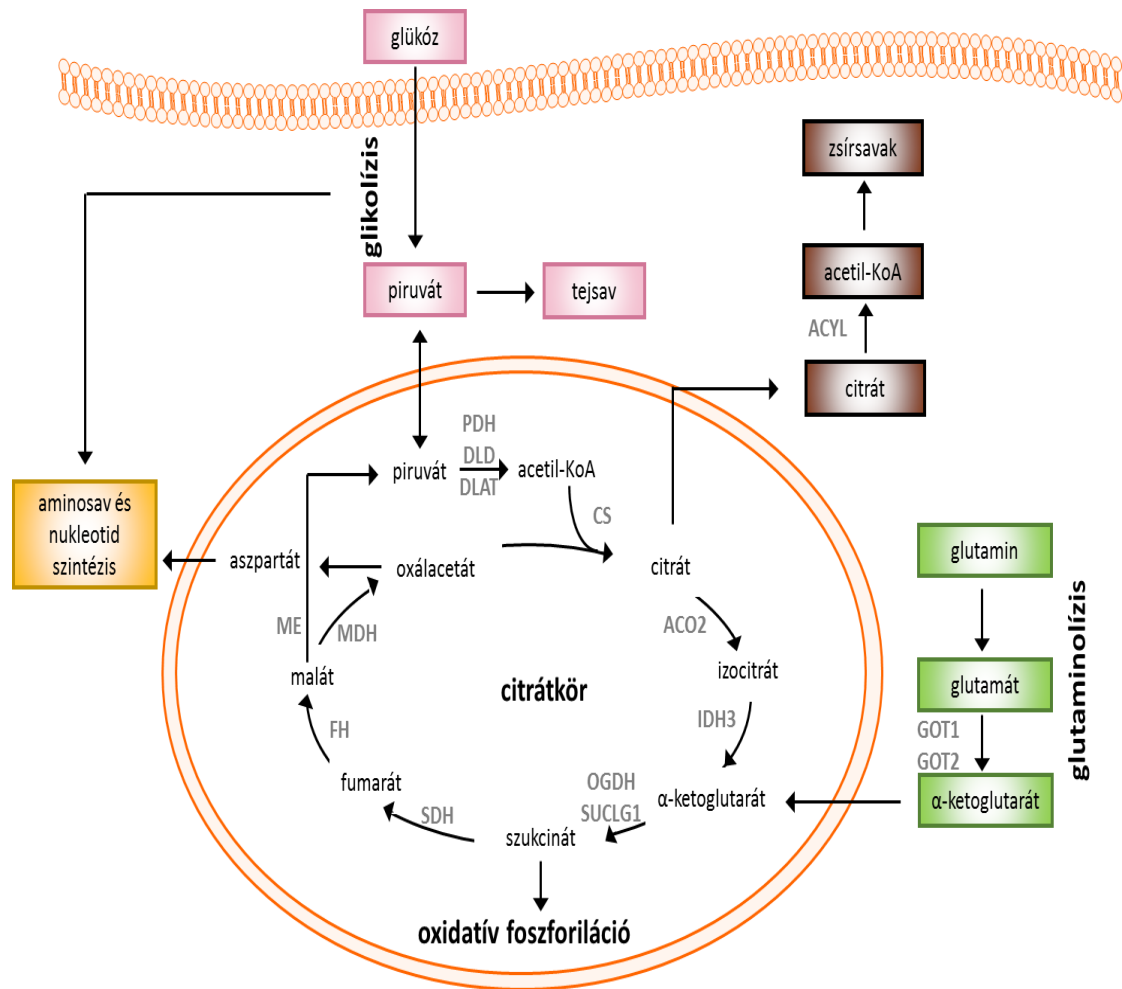
1.2.5. Citromsavciklus, oxidatív foszforiláció szerepe a daganatok anyagcseréjében

A citromsavciklusban (Szent-Györgyi–Krebs ciklus, trikarbonsav-ciklus - TCA vagy citrátkör) a szénhidrátok, zsírok és fehérjék alkotóelemei oxidálódnak CO₂-dá és vízzé alakulnak, közben ATP termelődik. A mitokondriumba belépő piruvát acetyl-csoporttá alakul, amely koenzim A-hoz kötődik és a citromsavciklusban az acetyl-KoA átadja két szénatomos acetyl-csoportját a négy szénatomból álló oxalacetátnak és így hat szénatomos citromsav keletkezik [33]. A citromsav ezután két karboxil-csoportját elveszíti CO₂ formájában, és a folyamat oxidatív lépéseiben NADH keletkezik, ami elektron donorként szolgál az oxidatív foszforilációban, az ATP termelésben. A négy szénatomos oxalacetátsav minden ciklus végén újraképződik, és a ciklus folytatódik [3, 6, 33].

Bizonyos tumorsejtek mitokondriumaiban a citrátkör működése megváltozik, ún. „csonka” citrátkör működik, ebben az esetben nagy mennyiségű citrát lép ki a citoszolba, és ott acetyl-KoA keletkezését eredményezve a zsírsav szintézisben hasznosul [34, 35]. A zsírsavak a keletkező új sejtek membránjainak felépítését szolgálják, ennek jelentőségét számos daganatsejt magas zsírsav-szintetáz enzim expressziója is alátámasztja (**4. ábra**) [34].

A citrátköri intermedierek számos anabolikus folyamat kiindulási anyagai. Ilyen például az oxalacetát és az α -ketoglutarát, amelyek aminosav szintézisben is felhasználódhatnak, így folyamatos pótlásuk szükséges. Azokat a biokémiai reakciókat, amelyek segítségével citromsavciklus intermedierek keletkezhetnek, így a citrátkör feltöltésére képesek, anaplerotikus reakcióknak nevezzük. Anaplerotikus reakciókban résztvevő enzimek lehetnek pl. a foszfoenol-piruvát-karboxikináz, amely foszfoenol-piruvátból oxalacetátot; vagy a glutamát-dehidrogenáz, amely a glutamátból α -ketoglutarát állít elő (**4. ábra**) [36, 37].

A citromsav ciklus különböző enzimjeinek (pl. akonitáz, izocitrát-dehidrogenáz, szukcinát-dehidrogenáz) mutációi olyan anyagcsere-változásokat idézhetnek elő a sejtekben, amelyek tumorsejtek kialakulásához és/vagy a daganat progressziójához járulhatnak hozzá [6, 38].



4. ábra Daganatbiológiai szempontból is jelentős anyagcsere-folyamatok (forrás: [39] alapján készített ábra). A citromsav ciklussal kapcsolatban álló lebontó és felépítő folyamatok (glikolízis, aminosav és nukleotid szintézis, citrátkör, oxidatív foszforiláció, glutaminolízis és zsírsav szintézis) vázlatos ábrája. A PDH (piruvát-dehidrogenáz,) DLD (dihidrolipoil-dehidrogenáz) és a DLAT (dihidrolipoil-transzacetiláz) a piruvát-dehidrogenáz enzimkomplex alegységei. CS: citrát-szintetáz, ACO2: akonitáz 2, IDH3: izocitrát-dehidrogenáz 3, OGDH: 2-oxoglutarát-dehidrogenáz vagy más néven α -ketoglutarát-dehidrogenáz, SUCLG1: szukcinil-KoA-ligáz α alegysége, SDH: szukcinát-dehidrogenáz, FH: fumarát-hidratáz vagy más néven fumaráz, MDH: malát-dehidrogenáz, GOT1/2: glutamát-oxaloacetát transzamináz 1/2.

1.2.6. Glutaminolízis

A tumorsejtek számára fontos nem esszenciális aminosav a glutamin. A Warburg-fenotípussal rendelkező daganatsejtekben a citromsav ciklus funkciójának fenntartásában és az intermedierek visszatöltésében nagy szerepe van a már említett anaplerotikus reakcióknak, erre példa a glutamin átalakítása és hasznosítása a citrátkörben [4, 40]. A glutamin transzporterek segítségével jut a sejtekbe, ahol a glutamináz (Gls) glutamáttá alakítja. A glutamátból a glutamát-dehidrogenáz α -ketoglutarátot (citromsavciklus intermedier) képez [41]. A glutamin prekuzora több nem esszenciális aminosavnak is (pl. aszpartát, alanin vagy prolin), nitrogéndonorként is szolgálhat a nukleotidok szintézisében; és fontos szubsztrát a zsírsav szintézisben hypoxiás daganatsejtekben (glutamátból képződő α -ketoglutarát redukzív karboxilációval citromsavvá alakul, mely tovább alakulva a lipid termelésben hasznosul). Végül, de nem utolsó sorban glutation szintézisen keresztül szerepet játszik az antioxidáns folyamatokban is [4, 40, 42, 43].

1.3. Onkometabolit-termeléssel összefüggő mutációk és anyagcsere-változások daganatokban

1.3.1. Az onkometabolitok fogalma

Az onkometabolitok olyan, az anyagcsere-folyamatokban (pl. glikolízis, citrát-ciklus) normálisan is megjelenő kis molekulák, amelyeknek kóros mennyiségi vagy szerkezeti változásai az anyagcsere-folyamatok szabályozásának megváltozását segítik elő, és ezen keresztül hozzájárulnak a daganatos sejtek túléléséhez, proliferációjához, a daganatos progresszióhoz [44].

1.3.2. Onkometabolit-termeléssel összefüggő anyagcsereenzim mutációk

Az anyagcsere-folyamatokban résztvevő enzimek funkcióvesztéssel (pl. fumarát-hidratáz, szukcinát-dehidrogenáz) vagy funkciónyeréssel (pl. izocitrát-dehidrogenáz) járó mutációi a sejtekben fumarát, szukcinát vagy D-2-hidroxi-glutarát onkometabolitok akkumulációjához vezetnek. Előbbiek szerkezete hasonló, ebből adódó, részben hasonló hatásaik nemcsak a sejtek anyagcseréjét, hanem az epigenetikai szabályozást (pl. hiszton metiláció) és a jelátviteli folyamatokat is befolyásolják [9, 44, 45].

A HIF-1 transzkripció faktor α alegysége a transzkripció mester regulátoraként működik a hypoxiás válaszreakciókban. Megfelelő oxigénellátottság mellett a citoplazmában található prolil-hidroxiáz enzim hidroxilálja a HIF-1 α fehérjét, ami ennek hatására ubiquitinálódik, majd a proteaszómában lebomlik [44]. A fumarát, szukcinát és 2-hidroxi-glutarát gátolja az α -ketoglutarát függő dioxigenáz enzimeket, köztük a prolil-hidroxiáz enzimet, így előbbi onkometabolitok felhalmozódásakor a HIF-1 α stabilizálódik és több célgén expresszióját módosíthatja. HIF-1 α , számos ismert onkogén hatása mellett, transzkripció faktoraként fokozza különböző glikolitikus fehérjék, pl. a glükóz transzporter 1 (GLUT1), hexokináz (HK) vagy laktát-dehidrogenáz A (LDH-A) expresszióját, így a sejtek anyagcseréjében (a metabolikus profilban) a glikolitikus irányú folyamatokat erősíti fel [8, 44, 46].

A következő alfejezetben a szukcinát-dehidrogenáz, fumaráz és izocitrát-dehidrogenáz anyagcsereenzimek mutációi és azok következményei kerülnek bemutatásra.

1.3.3. A leggyakoribb anyagcsereenzim mutációk és az azokkal összefüggő daganatos betegségek

A szukcinát-dehidrogenáz a mitokondriális energiatermelésben összeköti a citromsav ciklust és az elektrontranszportláncot. Az enzim alegységeit érintő (SDH A/B/C/D vagy F2) mutációk hatására, a funkcióvesztés következményeként felhalmozódik a szukcinát. A szukcinát felhalmozódása a HIF-1 α stabilizáció mellett fokozott aszpartát szintézist is előidézhethet [47]. Mindezek nagyban megnövelik a gasztrointesztinális stroma tumorok, vesecarcinoma, paraganglioma vagy pheochromocytoma kialakulásának esélyét (**5. ábra**) [47, 48].

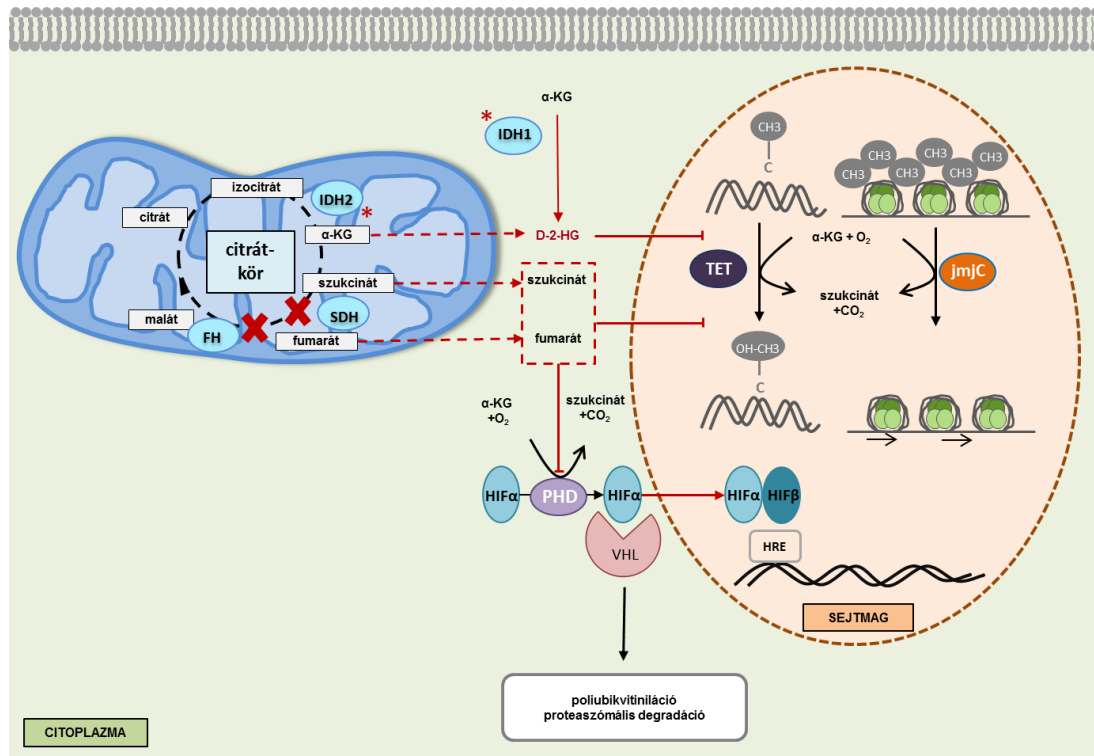
A fumarát-hidratáz (FH) a fumarát hidratációját végzi, eredményeként L-malát keletkezik. A FH csírvonal funkcióvesztő mutációt elsőként leiomyomatosisban és világossejtes vesedaganatokban írták le, de szerepük lehet a pheochromocytoma, II-es típusú papillaris vesecarcinoma patogenezisében is. A felhalmozódó fumarát a szukcináthoz hasonlóan hozzájárul a HIF-1 α stabilizációjához [8, 45].

Az izocitrát-dehidrogenáz (IDH) az izocitrát oxidatív dekarboxilációját katalizálja, melynek során α -ketoglutarát és CO₂ képződik, valamint egy NAD⁺ molekula NADH-vá alakul. Az IDH enzimnek három izoformája fordul elő: az IDH1 citoszolikus, míg az

IDH2 és az IDH3 mitokondriális. Mutációi az enzim funkciójának változásához (funkciónyeréshez) vezetnek, a mutáns enzimek az α -ketoglutarátot szubsztrátként használják és D-2-hidroxioglutaráttá alakítják át. A mutáns enzim NADH-t vagy NADPH-t fogyaszt, így hozzájárul a ROS (reaktív oxigén származék – szabadgyök) termeléséhez is. A D-2-hidroxioglutarát fokozza a HIF-1 α stabilitását, továbbá az előbbivel párhuzamosan gátolja a hiszton és DNS demetilázok működését is, így a genom globális hipermetilációját is eredményezi (**5. ábra**) [49, 50]. A 2-hidroxioglutarát L-2-hidroxioglutarát formában is jelen lehet a sejtekben, aminek képződését nem az IDH, hanem a malát-dehidrogenáz vagy a laktát-dehidrogenáz enzim katalizálja hypoxiás körülmények között. Az L-2-hidroxioglutarát azonban jóval kisebb mennyiségben képződik, mint az IDH mutáció következtében termelődő D-2-hidroxioglutarát [51].

Az IDH mutációk gyakoriak gliomákban, elsősorban „low grade” astrocytomákban, oligodendrogliomákban, szekunder glioblastomákban (80%), ritkábban primer glioblastomákban és gyerekkori agydaganatokban is előfordulnak. A gliomák kialakulásában az IDH mutáció megjelenését a tumorigenezis első lépésének tartják [52, 53].

Gliomákon kívül az IDH mutáció jellemző a felnőttkori akut myeloid leukémiák 15-20%-ában, a chondrosarcomák közel 50%-ában, de előfordul cholangio-, pajzsmirigy-carcinómában, vagy colorectalis carcinómában is. Míg gliomákban az IDH mutáció egyértelműen jobb prognózissal függ össze, aminek háttere még nem tisztázott, addig a többi daganattípusban általában rosszabb prognózissal társul [50, 54].



5. ábra. A szukcinát, fumarát és D-2-hidroxioglutarát onkometabolitok szerepe a HIF-1 α stabilizációjában és epigenetikai változásokban (forrás: [8] alapján készített ábra). A szukcinát, fumarát, D-2-hidroxioglutarát α -ketoglutarát függő dioxigenázokat gátolnak (kompetitív inhibitorai az α -ketoglutarátnak), ilyen például a prolil-hidroxiláz enzim is (PHD), melynek gátlása a HIF-1 α stabilizálásával és transzkripciós hatásainak fokozásával jár. Dioxigenázok mellett gátolt enzimek a TET (ten eleven translocation) és a jmjC (Jumonji C) demetilázok is, ami hipermetilált genotípust eredményezhet. α -KG: α -ketoglutarát; D-2-HG: D-2-hidroxioglutarát; HRE: hormon response element; VHL: von Hippel-Lindau fehérje

1.3.3.1. Gliómák: szövettani besorolás, IDH mutáció, lehetséges bioenergetikai szubsztrátok

A gliómák a leggyakoribb felnőttkori, központi idegrendszert érintő rosszindulatú daganatok. Gliális sejtekből alakulnak ki, melyek normális funkciója az idegrendszer tápanyag- és energiaellátásának biztosítása, továbbá a vér-agy gát funkciójának megőrzése. A gliasejtek részt vesznek a neuronhálózat homeosztázisának fenntartásában, de a különböző gliális sejtípusok más-más funkciókkal rendelkeznek.

Az astrocyták tápanyagellátást és támasztó, vázszerpet biztosítanak a neuronok számára; az oligodendrocyták az axonok mielinhüvelyét alkotják; a microglia sejtek fagociták, az elpusztult idegsejtek és patogének eltávolítását végzik; míg az ependymális sejtek a cerebrospinális folyadék egyensúlyt szabályozzák [55].

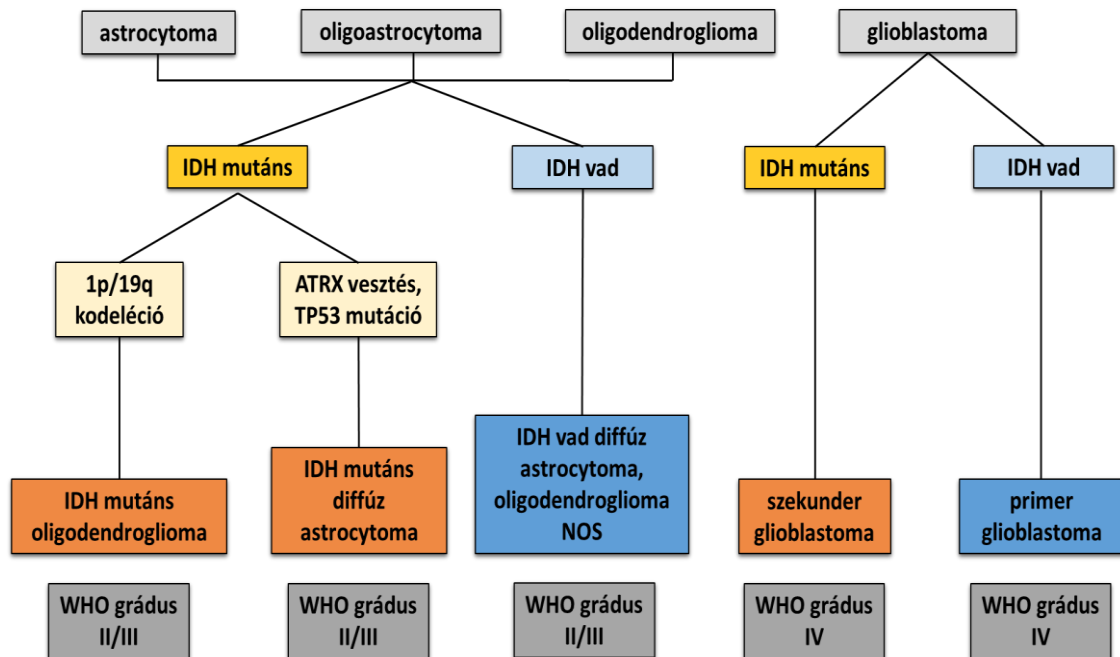
A glioma, összefoglaló elnevezés a gliális eredetű tumorok megkülönböztetésére, amelyek közé az astrocytomákat, az oligodendrogliomákat és a glioblastomákat sorolhatjuk [56]. A gliomák különböznek agresszivitásukban és malignitásukban. A lassan növekvő gliomák jobban kezelhetőek, míg a gyorsabban növekvő, invazív típusok kezelése nagy kihívást jelent, kevés sikerrel. Grádus szerint négy csoportot különböztetnek meg. „Grade I”: pilocytás astrocytoma, lassan növekvő, viszonylag könnyen kezelhető, felnőttekben ritkán előforduló daganat; „grade II”: „low grade” gliomák: astrocytomák és oligodendrogliomák, melyek fiatal felnőttekben fordulnak elő és esetenként átalakulhatnak III. vagy IV. grádusú gliomává; „grade III”: malignus gliomák, anaplasztikus astrocytomák és anaplasztikus oligodendrogliomák, melyek gyorsan és agresszíven növekvő daganatok, sebészeti eltávolításuk nehéz; „grade IV”: glioblastoma multiforme (GBM), a legagresszívabb és a leggyakoribb elsődleges agydaganat, az agy más területeire is gyorsan áttérjedhet [56, 57].

Az IDH mutációt bizonyos gliomák kialakulásában korai változásnak tartják. Az IDH1 mutáció következtében D-2-hidroxiglutarát onkometabolit akkumulálódik a sejtekben, ami epigenetikai és anyagcsere-változásokat, valamint a szabad gyök szint emelkedését okozva segíti a tumorprogressziót [52]. A WHO 2016-os patológiai glioma besorolásában az IDH mutáció az osztályozás egyik fontos tényezője, nagy százalékban fordul elő a gliomákban és prognosztikai szereppel is bír [56, 57]. Előbbiek mellett fontos genetikai tényező és az astrocytomák fontos markere, a magi ATRX (X-kromoszómához kapcsolt alfa-talasszémia/mentális retardáció) vesztese, illetve az oligodendroglioma sejtekben a 1p/19q kodeláció. Astrocytomákban összefüggést találtak az IDH mutáció és ATRX génvesztés előfordulása között: amennyiben az IDH vad, akkor ATRX vesztes sem jellemző a tumorra. Utóbbi genetikai változások a primer glioblastomákban – ahol az IDH mutáció nem jellemző – nagyon ritkán fordulnak elő. IDH mutáns gliomákban a citoszolikus IDH1 enzim (R132H) funkcionyeréses mutációja a leggyakoribb, ami a „low grade” gliomák és a szekunder glioblastomák közel 80%-ára jellemző, míg primer glioblastomákban ritkábban fordul elő (kb. 4-5%).

Az IDH1 R132H mutáns fehérje kimutatása immunhisztokémiai festéssel is elvégezhető. Amennyiben ez a festés negatív, további mutációk kimutatása szekvenálást (pl. Sanger szekvenálás) igényel, meghatározott betegcsoportokban (életkor és egyéb jellegzetességek) döntenek az IDH mutáció további vizsgálata mellett és ilyenkor az IDH1 és az IDH2 gén leggyakrabban érintett exonjainak szekvenálását végzik el (**6. ábra**) [56, 58].

A primer glioblastomák a leggyakoribb rosszindulatú agydaganatok, az összes glioma eset mintegy 50%-át adják, rossz prognózisú, agresszív tumorok, a medián túlélésük 12-14 hónap. Az IDH1 mutáció jelenléte jobb prognózissal jár, ahol a medián túlélés 3-15 év [59].

A gliomák terápiája háromféle kezelési lehetőségen alapul: sebészi eltávolítás, kemoterápia és besugárzás, melyeket a betegség típusától függően gyakran kombinálnak [60]. A műtét célja a daganat minél nagyobb részének eltávolítása. A sugárterápiában fontos, hogy a tumorsejtek elpusztítása mellett a normál szövetek kevésbé károsodjanak, ezért alacsony tumorgóc szám esetében célzott, sztereoataxiás eljárást alkalmaznak. A kemoterápiában a temozolomid alkilálószer (a guanin bázis alkilálásával indukálja a tumorsejtek apoptózisát) a leggyakrabban alkalmazott kezelés, de bizonyos esetekben használnak esetleg carmustint, ifosfamidot és procarbazint is [60].



6. ábra. A gliomák 2016-os hisztológiai osztályozása a WHO szerint (forrás: [67] alapján készített ábra). Az IDH1 mutáció a csoportosítás egyik legfontosabb paramétere mind astrocytomákban, mind oligodendrogliomákban. Utóbbiak további jellemzője az 1p/19q kromoszóma karok kodeléciónja is. ATRX: X-kromoszómához kapcsolt alfa-talasszémia/mentális retardáció; NOS: másképp nem osztályozható.

Számos gyógyszerfejlesztés, klinikai vizsgálat folyik, melyeknek célja, a gliomák hatékonyabb kezelése (eddig egyelőre nem sok eredménnyel). Progressziójuk során az IDH mutáns gliomák transzformálódhatnak magasabb grádusú, kevésbé differenciált szekunder glioblastomákká. Ilyenkor felmerül egyes gének amplifikációja (pl. EGFR, MET, MYC) és a PI3K/AKT/mTOR jelátviteli útvonal fokozott aktivitása is [61].

A legújabb adatok alapján a gliomasejtek a glükóz mellett (Warburg-effektus) más szubsztrátokat is képesek hasznosítani energiatermelő folyamatokban. Maher és munkatársai leírták, hogy tápanyag, glükóz megvonás esetén gliomákban az acetát is fontos energiaszubsztrát lehet [62, 63]. Az acetátot acetyl-KoA-vá alakító acetyl-KoA szintetáz 2 (ACSS2) enzim expressziója daganatsejtekben fokozott, ami a gliomasejtek túlélését is segítheti és hozzájárulhat a rossz prognózishoz [62, 64]. Gliomasejtekben további szubsztrát lehet a glutamin is, amit számos tumorsejt hasznosít energia és proliferációs igényének fedezésére [43]. Az astrocyták fontos szerepet játszanak a

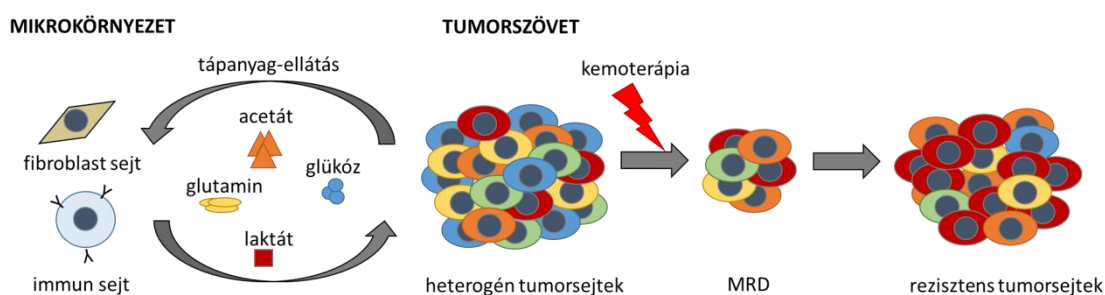
GABAerg és glutamáterg neuronok tápanyagellátásában, valamint a glutamát és gamma-amino-vajsav (GABA) neurotranszmitterek megfelelő koncentrációjának biztosításában, fenntartásában. Az astrocyták képesek az axonok végződéseinél termelődő glutamát és GABA felvételére, majd lebontására, így korlátozzák ezeknek a neurotranszmittereknek a hatását [65]. A neuronok és az astrocyták között ún. metabolikus szimbiózis alakul ki. A GABA transzporterén (GABA transzporter 1) keresztül a sejtekbe kerül, majd GABA-transzamináz és szukcinát szemialdehid-dehidrogenáz enzimek hatására szukcináttá alakulhat, ami belépve a citromsavciklusba részt vehet mitokondriális oxidációs folyamatokban [65, 66]. A GABA oxidációját tumorsejtekben még nem vizsgálták.

1.4. Metabolikus adaptáció és heterogenitás

A tumorsejtek bizonyos része képes alkalmazkodni a legextrémebb, megváltozott környezethez, tápanyag-ellátottsághoz és gyógyszeres kezeléshez. A daganatsejtek anabolikus folyamatainak intenzitása hasonló a normál, gyorsan proliferáló sejtekéhez. A tumorsejtek glükóz és glutamin felvétele, hasznosítása fokozott, utóbbiak lebontásának termékei intermedierjei lehetnek a citromsavciklusnak, az oxidatív foszforilációnak (energianyerés), a pentóz-foszfát-útnak (nukleinsav szintézis), az aminosavak szintézisének (így a fehérjetermelés is) és a lipid szintézisnek egyaránt. Ezek a folyamatok szükségesek ahhoz, hogy a proliferációhoz megfelelő mennyiségű energia (ATP) és intermedierekből képződő makromolekula álljon rendelkezésre [7, 68, 69]. A malignus sejtek laktátot, acetátot, szabad zsírsavakat és ketontesteket is képesek felvenni a mikrokörnyezetükből, melyeket oxidációs folyamatokra, kémiai energiatermelésre vagy akár anabolizmusra is használhatnak. A tumorsejtekben gyakran magas ROS szint miatt nagyfokú antioxidáns molekula szintézisére van szükség; a pl. pentóz-foszfát-út segítségével NADPH termelése. A NADPH antioxidáns hatása mellett kulcsfontosságú elektrondonorként szolgál a lipid szintézisben [69,70]. Az említett útvonalak és energiaszubsztrátok nagy száma elősegíti a daganatsejtek nagymértékű alkalmazkodóképességét a megváltozott környezeti feltételekhez. Egyes tumorsejtek rendkívül gyorsan alkalmazkodhatnak metabolikus szinten a megváltozott körülményekhez (például Crabtree-effektussal rendelkező sejtek, melyek könnyedén

tudnak glikolízisről oxidatív foszforilációra váltani vagy fordítva), ami szelekciós előnyt jelent a tumor túlélésében [4, 68]. A nagyfokú metabolikus plaszticitással rendelkező daganatsejtek hozzájárulhatnak a gyógyszeres terápiára adott rezisztencia kialakulásához is. Fontos kiemelni azonban, hogy a metabolikus adaptációs képesség nagyban függ az aktiválódott onkogénektől, inaktiválódott tumorszuppresszor génektől és az aktív jelátviteli útvonalaktól is [7, 70, 71].

Egy daganaton belül sokféle genetikai és metabolikus profillal rendelkező tumorsejt-populáció lehet (tumor heterogenitás). A tumorprogresszió vagy gyógyszeres kezelés közben a szelekciós nyomás hatására a különböző jellegű tumorsejtek mennyisége, aránya változhat, egyes populációk eltűnhetnek vagy akár újak jelenhetnek meg [72, 73]. A daganaton belül a sejtek anyagcseréjét jelentősen befolyásolja a mikrokörnyezet pl. az oxigénellátottság (erektől való távolság). Biztosított tápanyag- és oxigénellátás mellett a daganatsejtek ATP-t aerob módon, oxidatív foszforiláció segítségével állíthatják elő [69, 73], de oxigén vagy tápanyaghiányos környezetben a Warburg-effektus mellett akár autofágiás mechanizmusok is aktiválódhatnak a sejtek túlélése érdekében. A stromasejtekben pl. fibroblastokban oxidatív stressz hatására is aktiválódhatnak gyakorlatilag hasonló mechanizmusok. A sejtek a glikolízis során termelt metabolitokat (pl. tejsav) az extracelluláris térbe juttatják, amelyeket az oxidatív tumorsejtek vagy más mikrokörnyezeti sejtek felvehetnek, felhasználhatnak pl. oxidálhatnak energianyerés céljából (reverz Warburg-effektus) [26, 29]. A fenti folyamatok és a daganatszövet metabolikus heterogenitása fontos szerepet játszik a tumorprogresszióban és a terápia rezisztencia kialakulásában (7. ábra) [4, 74, 75].



7. ábra. Az intratumorális heterogenitás, metabolikus szimbiózis és tumor progresszió kapcsolata szolid daganatokban. A tumorprogresszió során egy adott daganaton belül különböző szubsztrát preferenciájú és metabolikus profilú tumorsejtek

lehetnek jelen, ezt más néven intratumorális metabolikus heterogenitásnak nevezzük. A tumoron belül a daganatsejtek más tumorsejtekkel, stromasejtekkel (pl. fibroblastokkal) kommunikálnak; ez és az előbb említett metabolikus heterogenitás az egyik lehetséges oka a daganatok kemoterápiás kezelésekkel szembeni rezisztenciájának. A kemoterápiás kezelés során a tumorsejtek metabolikus alkalmazkodóképessége hozzájárulhat a terápia sikertelenségéhez. MRD: minimális reziduális betegség.

1.5. Anyagcsere-folyamatok szabályozása

A tumorsejtekben a lehetséges anyagcsere-változások szorosan összefüggnek az onkogének aktivációjával, a tumorszuppresszor gének inaktivációjával és a jelátvitel szabályozási zavaraiival. A PI3K/AKT útvonalon számos onkogenikus változás ismert pl. az Akt (protein kináz B) hiperaktivációja, a MAPK/ERK útvonalban a RAS mutációja vagy akár MYC és HIF-1 transzkripciós faktorok expressziójának fokozódása, amelyek a sejtek anyagcsere-változásait is befolyásolják [76, 77]. A sejtciklus szabályozásában szerepet játszó p53 gén kiesése vagy a RAS mutáció is módosítja a sejtekben megfigyelhető anyagcsere-változásokat [7, 77]. A RAS onkogén a humán tumorok közel 25%-ában, míg a p53 körülbelül 50%-ban mutáns vagy deletált [6, 79]. A p53-nak jól ismertek a sejtciklus szabályozó és DNS károsodások esetén aktiválódó funkciói. Újabb vizsgálatokban a p53 funkcióvesztésének szerepét az aerob glikolitikus fenotípus kialakulásában, a GLUT1 és a hexokináz expresszió fokozásában is leírták [80, 81]. A RAS onkogén mutációja leggyakrabban a RAS GTP-kötő régióját érinti; így a fehérje GTP-áz aktivitása kiesik, ezért nem képes az inaktív GTP-GDP átalakulás katalizálására, így folyamatosan aktiválja a „downstream” folyamatokat [78].

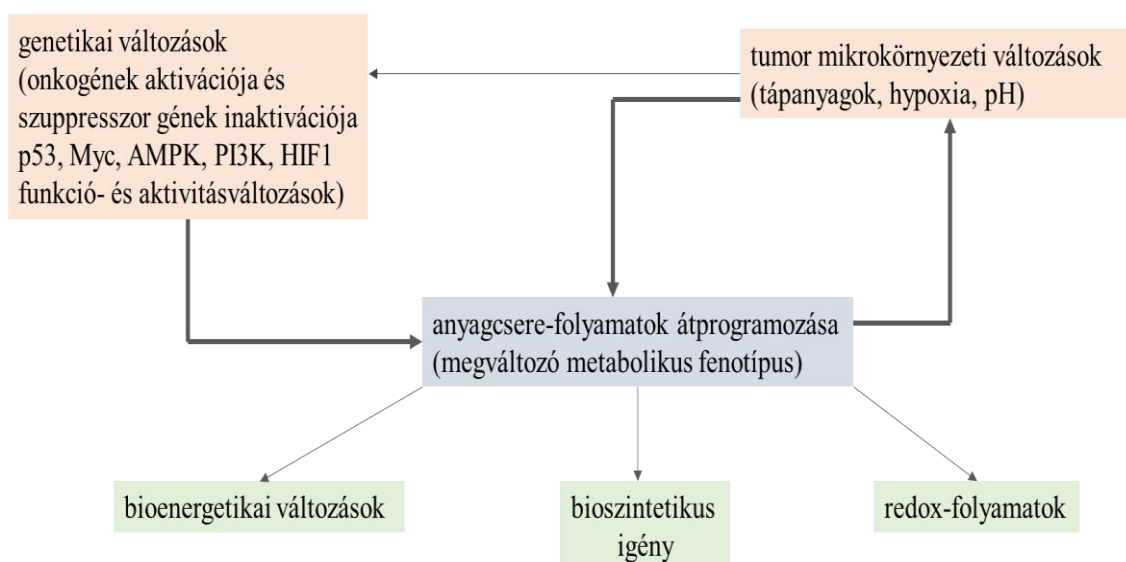
A HIF-1 α fontos szerepet játszik a hypoxiás körülményekre adott adaptációs sejtválaszokban, számos metabolikus célgén expresszióját is módosítja. A HIF-1 expresszió emelkedése fokozza a glikolízist, tejsavtermelést, a glükóztranszportot, a hexokináz aktivitását, a laktát-dehidrogenáz és a monokarboxilát transzporter működését is, ezzel szemben gátolja a citrátkör működését és az oxidatív foszforilációt [77, 78].

A MYC jól ismert onkogén hatású transzkripciós faktor gyakran fokozottan expresszált az osztódó tumorsejtekben. A MYC az anyagcsere-folyamatok szabályozásában fontos gének közel 15%-ának szabályozását befolyásolja, köztük a

glükóz metabolizmust (MCT1 expressziójának fokozása), a mitokondriális biogenezist és a glutaminolízist is [4].

A PI3K/AKT/mTOR útvonal konstitutív aktivitását számos daganatban leírták, a különböző szabályozó elemeinek mutációja vagy a kináz kaszkád elemeinek aktiváló mutációi is ismertek. Az útvonal fokozott aktivitása összefügg a reduktív karboxiláció, „csonka” citrátkör, zsírsav szintézis emelkedésével, fokozott glikolízissel (pl. GLUT1 expresszió emelésével), valamint a gátolt zsírsav oxidációval (pl. a PI3K/AKT aktiváció eredményeként emelkedő ATP-citrát-liáz lecsökkenti a karnitin-palmitoil-transzferáz expressziót) [82]. Az mTOR fehérjekomplexek kiemelt jelentőségűek a sejtek proliferációjának, túlélésének és anyagcseréjének szabályozásában, ami a következő fejezetben (PI3K/AKT/mTOR jelátvitel) kerül részletes ismertetésre [71, 82].

A tumorsejtek metabolikus profilját a genetikai változások, a daganatok kialakulásában résztvevő szabályozási zavarok és a tumor mikrokörnyezeti hatásai együttesen befolyásolják. Az említettekhez alkalmazkodva a sejt optimalizálja működését, annak érdekében, hogy a proliferációhoz, túléléshez szükséges energiaforrások felhasználását és a szükséges bioszintetikus útvonalakat biztosítsa (nukleinsavak, fehérjék, lipidek és szénhidrátok felépítéséhez szükséges építőelemeket) (8. ábra) [7, 83].



8. ábra. A metabolikus fenotípust befolyásoló és szabályozó tényezők daganatsejtekben (forrás: [83], saját közlemény módosított ábrája). A tumorsejtek metabolikus profilját, domináns anyagcsere-útvonalait a genetikai változások és a

mikrokörnyezeti hatások együttesen meghatározzák. A tumorsejt az előbbiekhöz alkalmazkodva biztosítja a proliferációhoz, túléléshez szükséges energiát és a bioszintetikus folyamatokat, ezek a folyamatok pedig kölcsönösen hatnak egymásra (nukleinsavak, fehérjék és zsírok felépítéséhez szükséges intermedierek biztosítása).

1.6. Metabolikus gátlók, a daganatsejtek anyagcseréjét befolyásoló hatóanyagok és célpontjaik

A legtöbb kemoterápiás szer hatása a tumorsejtek fokozott proliferációs képességének gátlásán alapul. Több hatóanyag is a daganatsejtek nukleinsav szintézisét gátolja (pl. 5-fluorouracil, metotrexát, fludarabin), azonban a tumorok jó része rezisztenssé válhat a jelenlegi kezelésekre, emiatt sokszor módosítani kell a kezelési stratégiát. A rezisztencia problémák hátterében a megváltozott körülményekhez alkalmazkodást biztosító metabolikus változások is hozzájárulnak [84]. Fontos megismernünk a domináns anyagcsere-folyamatokat és feltérképeznünk a legjobban, leggyorsabban alkalmazkodó tumorsejtek bioenergetikai jellemzőit, így teremtve lehetőséget a rezisztens daganatsejtre jellemző bioenergetikai útvonalak célzott gátlására. A kezdeti metabolikus profil azonban a progresszió során vagy a kezelés hatására is változhat, ezért ezek követésére, meghatározására megfelelő módszerek szükségesek. Ebben az alfejezetben több lehetséges tumorsejtekre jellemző anyagcsere-változás (pl. aerob glikolízis, mitokondriális oxidáció, glutaminolízis, mutáns IDH enzim hatása) és azok gátlásának lehetőségeit foglalom össze [85].

1.6.1. Glikolízis gátlók

Az aerob glikolízis (Warburg-effektus) a tumorsejtek nagy százalékára jellemző. A fokozott glikolízisben a glükóz transzporter 1-nek (GLUT1), hexokináznak és laktát-dehidrogenáznak kiemelt szerepe van. GLUT1 gátlók például a WZB117 és a silibinin preklinikai vizsgálatokban tumorelles aktivitást mutattak mind *in vitro*, mind *in vivo* kísérletekben [4]. Hexokináz gátló tulajdonságú 2-deoxiglükóz, 3-brómpiruvát és lonidamin proliferáció gátló hatását preklinikai modellekben igazolták, azonban klinikai vizsgálatokban (lonidamin fázis II.) sikertelennek bizonyultak. A laktát-dehidrogenáz enzim gátlása preklinikai vizsgálatokban mutatott tumor ellenes hatást [4, 6, 86].

1.6.2. Mitokondriális támadáspontú gátlószer

Oxidatív foszforilációt gátló vegyületek közül a légzési lánc komplex I-et gátló metformin és fenformin hatásait részletesen tanulmányozták. A két szer a komplex I gátláson keresztül fokozza az AMPK foszforilációt, AMPK aktivitást. A II-es típusú cukorbetegség terápiájában törzskönyvezett metformin preklinikai modellben tumornövekedést gátló hatásának bizonyult, jelenleg fázis III vizsgálatokban tesztelik [4]. Mitokondriális komplex III gátló tulajdonságú az arzén-oxid, amit az FDA elfogadott akut promyelocytás leukaemia terápiájában. A mitokondriális biogenezis, mitokondriális transzláció gátlására alkalmas a doxiciklin és a tigeciklin, amelyek több preklinikai vizsgálatban *in vivo* daganatellenes hatást mutattak (pl. doxiciklin eredmények non-Hodgkin lymphomák fázis II) [4].

1.6.3. Glutaminolízis gátlók

A glutaminhasznosítás terápiás célpont lehet azokban a daganatokban, amelyek jelentős glutamin fogyasztást mutatnak. Glutamináz enzim gátló hatóanyagok a BPTES és CB-839, gátolják a citrát-ciklus anaplerózisát, proliferáció gátló hatásukat *in vitro* és *in vivo* is igazolták. Utóbbi kedvező hatását több szolid tumor fázisvizsgálatában vizsgálják (pl. glioblastoma, vesedaganat, tripla-negatív emlőrák) [87-89].

1.6.4. Egyéb gátlószer

A részletesen tárgyalt mutáns IDH enzim funkciójának gátlására többféle szer is fejlesztettek, az AG-221 – enasidenib - mutáns IDH2 gátló; a AG-120 – mutáns IDH1 gátló; a AG-881 pedig – pan-mutáns IDH1/2 gátló, melyekkel fázis vizsgálatok zajlanak. Az enasidenib IDH2 mutáns kiújuló akut myeloid leukaemia kezelésében 2017-ben bevezetésre került [53, 90].

Az mTOR kináz számos szabályozó funkciója mellett metabolikus szabályozó molekula is, így a fokozott PI3K/AKT/mTOR aktivitás is befolyásolja az anyagcserét. Az mTOR érzékeli a sejtek energia- és tápanyag-ellátottságát és integrálja a különböző növekedési faktorok hatásait. Nevét gátlószeréről kapta, a rapamycin a sejtekben az FKBP12 (FK506-binding protein of 12 kDa) fehérjével komplexet alkot és az mTOR FRB régiójához kötve gátolja kináz aktivitását. A rapamycin makrolid típusú

hatóanyag, gombaellenes és immunszuppresszív hatásai miatt kezdték alkalmazni, napjainkban már egyes daganatok kezelésében is használják (*lásd később*).

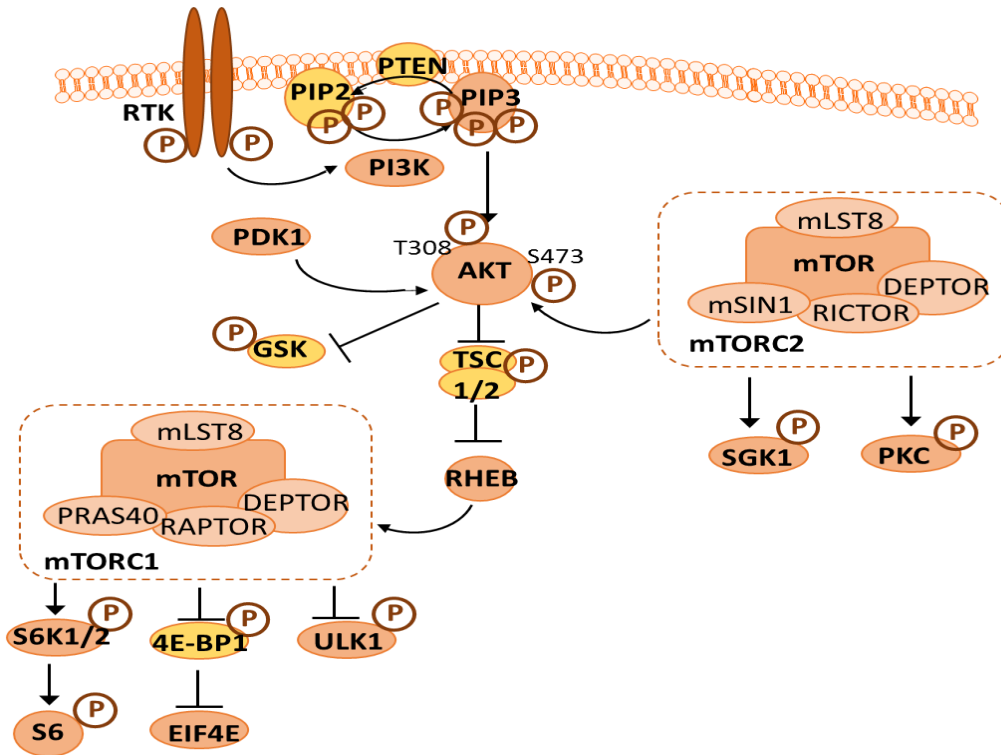
A felsoroltak mellett több metabolikus folyamatot (lipid anyagcsere, autofágia, pentóz-foszfát-út) gátló vagy aktiváló hatóanyag preklinikai és klinikai kipróbálása zajlik. Az enasidenibhez hasonlóan más anyagcserét befolyásoló hatóanyagok daganatterápiás törzskönyvezése is várható. Azonban a megfelelő betegcsoportok kiválasztásához meg kell ismerni és figyelembe kell venni a daganaton belüli metabolikus heterogenitást és a tumorsejtek metabolikus adaptációs képességét.

1.7. PI3K/AKT/mTOR jelátviteli útvonal

PI3K/AKT/mTOR útvonal kiemelkedő szerepet tölt be a sejtciklus szabályozásában és sejtnövekedésben, a túlélésben és az anyagcsere-szabályozásban is. Az útvonal aktivitása számos daganattípusban fokozódik [91, 92]. A PI3K-okat (foszfatidil-inozitol-3-kináz) sejt felszíni tirozin-kinázok és más receptor molekulák (pl. hormonok és mitogén faktorok) (RTK-k) vagy G-fehérjéhez kapcsolt receptorok (GPCR) aktiválják. Az I. osztályba tartozó PI3K-nak elsődleges szerepe a foszfatidil-inozitol 4,5-biszfoszfát foszfatidil-inozitol 3,4,5-triszfoszfáttá (PIP3) alakításában van, majd a PDK1 (3-foszfoinozítid-függő protein kináz-1) és Akt intracelluláris fehérjék aktiválásában van [91, 93]. Az Akt daganatbiológiai szerepe szerteágazó, támogatja a sejtnövekedést és túlélést, emellett az epiteliális-mezenhimális átalakulást, a tumorsejtek invázióját, pl. mátrix metalloproteázok termelésének fokozásán keresztül [94, 95].

Az Akt egyik jelentős hatása az mTOR aktiválásban játszott szerepe, igaz az mTOR Akt független módon is aktiválódhat (pl. sejt tápanyag-ellátottsága, az AMP mennyisége vagy az oxigénszint is befolyásolják működését). Az Akt a TSC1/2 (tuberous sclerosis 1 és 2) fehérjék foszforilációján, inaktiválásán keresztül és így az RHEB kináz aktiválásával vesz részt az mTOR foszforilációban, aktivációjában [96, 97]. Az mTOR aktivitása is hatással van azonban az Akt funkcióira, az Akt aktivitását 473-as szerin foszforiláción keresztül fokozza, ami bizonyos Akt függő hatásokhoz (pl. túlélés biztosítása, apoptotikus útvonalak gátlása) nélkülözhetetlen [97,98]. Az útvonalnak több negatív szabályozó eleme közül jól ismert a TSC vagy a PTEN (phosphatase and tensin homologue. [93, 99] (**9. ábra**). A PTEN (phosphatase and tensin homologue), ami a PIP3 defoszforilálásával gátolja a szignált, ezért a PH-

részekkel rendelkező fehérjék (például PDK1 és Akt) nem tudnak a plazmamembránhoz kötődni és aktiválódni (9. ábra) [93, 99].



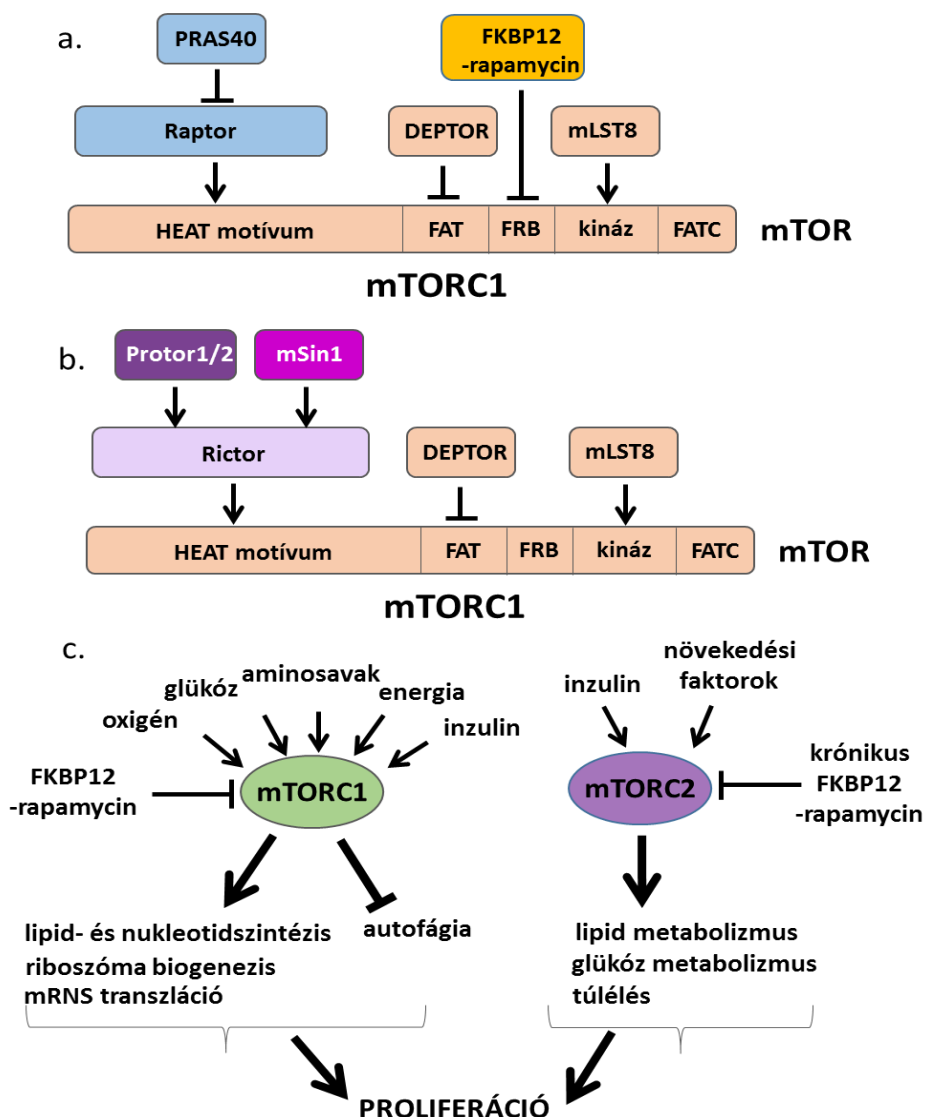
9. ábra. RTK/PI3K/AKT/mTOR jelátviteli pálya és annak elemei (forrás: [11] alapján készített ábra). Az RTK aktiválódása és intracelluláris foszforilációja fokozza a PIP2 PIP3-má történő alakítását, mely a PH domént tartalmazó fehérjékhez köt, például az Akt-hoz (más néven PKB). Az Akt fehérjét a T308-on (treonin 308) a PDK1; S473-on (szerin 473) az mTORC2 foszforilálja és aktiválja. Az Akt a TSC1/2-t és a GSK3-t gátolja. A RHEB fehérje TSC1/2 foszforilációja után az mTORC1 komplexet aktiválja. Az mTORC1 foszforilálja az S6K1/2-t (S6 kináz), fokozva ezzel annak transzlációs hatásait, míg a 4E-BP1-et (4E kötő fehérje 1) foszforilálva inaktiválja, így fokozza az EIF4E – elongációs iniciációs faktor 4E fehérje aktivitását és az általa közvetített hatásokat; valamint foszforilálja és inaktiválja az ULK1-t (Unc-51 like autophagy activating kinase 1) így gátolja az autofágiát. Az mTORC2 az SGK1 (szérum glükokortikoid kináz 1) és PKC (protein kináz C) fehérjéket is foszforilálja, aktiválja [98,100].

1.7.1. mTOR komplexek szerkezete és funkciói

Az mTOR központi regulátora az emlős sejtek anyagcseréjének, működésének – mTOR „knock-out” egér pl. életképtelen – fontos funkciót tölt be a máj, izmok, agy, zsírszövetek (fehér és barna) normál működésében. Működési zavarait összefüggésbe hozzák a cukorbetegséggel, az elhízással, a depresszióval, az öregedéssel és a daganatok megjelenésével is [92, 94].

Az mTOR szerin/treonin kináz nevét az 1970-es években Húsvét-szigeten (Rapa Nui) felfedezett *Streptococcus hygroscopicus* baktériumfajból izolált molekuláról (rapamycin) kapta, melynek elsőként antifungális és immunszuppresszív, később pedig daganatellenes hatását is felfedezték. Az mTOR kinázt szerkezete alapján foszfatidil-inozitol-3-kinázt kötő kináz (PIKK) csoportba sorolható. N-terminális végén két α -hélixből álló HEAT (Huntington, elongációs faktor 3, PR65/A) motívum található. Ezt C-terminális irányba haladva egy FAT (FRAP–ATM–TRRAP) domén követi, mely az FRB (FKBP12-rapamycin-kötő) domén következik. Az FRB régióhoz nagy affinitással képes kötődni az FKBP12-rapamycin komplex, ami gátolja az mTOR aktivitását. Az FRB régió után található a kináz domén, majd ezt követi a szabályozó funkciót ellátó PRD domén (protein reguláló domén). A fehérje C-terminálisán a FATC (FRAP-ATM-TRRAP-C-terminal) régió található (**10. ábra**) [100, 101].

Eukariótákban nem egy, hanem kétféle TOR kináz komplex működik: az TOR komplex 1 (TORC1) és az TOR komplex 2 (TORC2). Az TORC1-nek kiemelkedő szerepe van a sejtek növekedésében és a stresszhelyzetekhez való alkalmazkodásában, így az ezekkel összefüggésben lévő sejtanyagcsere-folyamatok szabályozásában [97, 98]. Az emlős TORC1 komplexben (mTORC1) a kináz (mammalian/mechanistic target of rapamycin – mTOR kináz) mellett a Raptor (regulatory associated protein of mTOR) vázfehérje, a G β L/MLST8 fehérje (mTOR asszociált protein LST8 homológ) található, és kapcsolódhatnak negatív szabályozó fehérjék is a komplexhez - a DEPTOR (DEP-domain interactor of mTOR) és a PRAS40 (proline-rich AKT substrate of 40 kDa). (**10. ábra**) [98, 102, 103].



10. ábra. Az mTOR fehérje doménjei és az mTORC1 és C2 által integrált és szabályozott tumorbiológiai folyamatok (forrás: [100] alapján készített ábra). A C1 (a.) és C2 (b.) komplex alegységeit és az mTOR fehérje doménszerkezetét (HEAT: Huntington, elongációs faktor 3, PR65/A; FAT: FRAP–ATM–TRRAP; FRB: FKBP12-rapamycin-kötő; FATC: FRAP-ATM-TRRAP-C-terminal); illetve a két mTOR komplex sejtek proliferációját, növekedését érintő szabályozási kapcsolatait (c.) mutatom be az ábrán.

A szerkezeti vizsgálatok eredményei alapján az mLST8 az mTOR kináz doménjéhez köt, míg a rapamycin-FKBP12 komplex az FRB motívumhoz kapcsolódhat, a katalitikus helyen kizárva a szubsztrátokat az aktív centrumból, amely az mTOR komplex aktivitásának gátlását eredményezi. Az mTORC1 a sejtek energia-, tápanyag-

és oxigénellátottságát monitorozó útvonalakkal áll kapcsolatban, elősegíti az anabolikus folyamatokat (proliferáció), gátolja a katabolikus folyamatokat (autofágia), de szerepe van a glikolízis, a lipid szintézis és a nukleinsav szintézis vagy akár az angiogenezis szabályozásában is [104, 105, 106]. Az mTORC1 kináz foszforilálja az S6K-t és az eukarióta transzlációs iniciációs faktor 4E-kötő fehérjét (4E-BP), ezekkel elősegítve számos fehérje transzlációját; pl. fokozza a ciklin D1 expressziót, a HIF-1 α transzlációját. Az mTORC1 megfelelő tápanyag-ellátottság esetén negatívan szabályozza az autofágiát, pl. az autofágia iniciációs komplex fehérjéinek inaktiválásával pl. ULK1 foszforiláció [107, 108]. További anyagcsere-szabályozási szerepét később mutatom be.

Az mTORC2 komplex alkotói a kináz mellett - hasonlóan az mTORC1 komplexhez - az mLST8, a Raptor helyett egy másik vázfehérje, a Rictor (rapamycin insensitive companion of mTOR), valamint további alkotó még az mSin1 és a Protor 1/2. A mSin1 és a Protor szabályozó funkciókat látnak el. A legújabb röntgen kristály-térszerkezeti vizsgálatok eredményei igazolják, hogy az mTORC2 komplexben FKBP-12-rapamycin az FRB régió helyzete miatt nem képes kötődni a komplexhez [98, 100]. Egyes hosszú távú mTORC1 gátló kezelések esetében azonban a C2 komplex aktivitásának csökkenését is kimutatták, amit az mTORC1 aktivitás mTORC2 komplex kialakulását szabályozó funkcióival magyaráznak (**10. ábra**) [100, 109, 110].

1.7.2. mTOR és az anyagcsere-szabályozás kapcsolata tumorokban

Az mTOR komplexek aktivitása hozzájárul a proliferációhoz szükséges bioenergetikai folyamatok támogatásához. A magas mTOR aktivitás elősegíti a Warburg-effektus kialakulását: a glükóz transzporter (például GLUT1) és a glikolízisben résztvevő enzimek (hexokináz, foszfofruktokináz) expressziója megnövekszik, citrát-ciklus működése megváltozik („csonka” citrátkör), módosul a zsírsav szintézis (ATP-citrát-liáz expresszió fokozása, karnitin-palmitoil-transzferáz expresszió csökkenése), amely folyamatok a képződő kémiai energia mellett, a különböző intermediereken keresztül hozzájárulnak számos bioszintetikus igény kielégítéséhez [93, 96]. Az mTORC1 szerepe a fehérje szintézis szabályozásában került először jellemzésre, a későbbiekben azonban központi szerepe az anabolikus és a

katabolikus folyamatok egyensúlyának fenntartásában is felismerésre és egyre pontosabb leírásra került [111, 112].

Az S6K1 aktiválását az mTOR a 389-as treonin foszforilációjával segíti. Az S6K az S6 riboszomális protein foszforilációjával segíti a transzláció folyamatait, de a CAD (karbamoilfoszfátáz szintetáz 2; aszpartát-transzkarbamiláz; dihidro-orotáz) foszforilációján keresztül támogatja a pirimidin szintézis néhány lépését is. Az S6K1 aktivitása hozzájárul a SREBP (sterol regulatory elements binding protein 1-2) fehérjék aktiválásához is, ami transzkripciós faktorként fokozza a lipid biogenezisben (zsírsavak, koleszterin és NADPH szintézise) és a nukleotid szintézisben (pentóz-foszfát-út fokozása) szerepet játszó fehérjék génexpresszióját [96, 113]. Az mTORC1 komplex előbbtől függetlenül a lipint (foszfatidsav-foszfát) foszforilációval inaktiválja, így tovább fokozza az SREBP transzkripciós hatásait. Az mTORC1 aktivitását az intracelluláris aminosav koncentráció képes befolyásolni RaG GTP-áz szabályozók közreműködésével, a fehérjekomplex lizoszomális transzlokációján keresztül [96, 114].

Az mTORC1 a lebontó folyamatok gátlásával is segíti a sejtek növekedését, például megfelelő tápanyag-ellátottság esetén gátolja az autofágiát, az autofágia iniciációs komplexben (ATG1/ULK iniciációs komplex) található ULK1 (autophagy initiating kinase) és az ATG13 fehérjék foszforilálásán keresztül [106]. Az éhezéskor az ATG13 foszforilációs szintje előbbieket miatt csökken, de ilyen állapotban az AMPK mTOR függetlenül foszforilálja az ULK1-et is (S317-en), segítve az autofágia mechanizmusát [106, 115].

Az mTORC1 és mTORC2 többféle mechanizmuson (pl. transzkripciós faktorokon, illetve a fehérje szintézis riboszomális folyamatain) keresztül szabályozhatja a c-MYC expresszióját [96]. A c-MYC fokozza a glikolízis és a glutaminolízis folyamatában résztvevő enzimek/transzporterek expresszióját (pl. glükóz transzporterek, LDH-A, glutamin-transzporter, glutamináz enzim) [116, 117].

Összefoglalásként elmondható, hogy míg az mTORC1-komplex szabályozó szerepe elsősorban a glikolízis fokozásában, nukleinsavak, lipidek és fehérjék bioszintézisében kulcsfontosságú, addig az mTORC2 elsősorban az Akt Ser473-as foszforilációján keresztül járul hozzá bizonyos metabolikus folyamatok szabályozásához (pl. glükoneogenezis gátlása) [100, 118].

Nem véletlen, hogy az mTOR komplexek szabályozási zavarainak szerepét a daganatok mellett számos betegség köztük az inzulinrezisztencia, az Alzheimer kór és a Parkinson kór kialakulásában is egyre több adat támogatja [100, 108].

1.7.3. mTOR gátlók

Az mTOR inhibitor (mTORC1 gátló) rapamycint először – T sejt aktivációt blokkoló hatásaira alapozva – immunszuppresszív szerként törzkönyvezték 1999-ben (szervtranszplantáció). A rapamycin tumornövekedést gátló hatását már a 80-as években felismerték több humán sejtvonal *in vitro* vizsgálatában, majd 2002-ben írták le *in situ* direkt daganatnövekedést gátló hatásait vesetranszplantált beteg poszttranszplantációs tumorának kezelése közben [119]. Ezt követően számos vizsgálat indult, melyeknek végeredményeként néhány évvel később törzkönyvezték az első rapalógot onkológiai kezelésben. Farmakokinetikai okokból (oldékonyság és stabilitás) a rapamycin származékok (rapalógok) fejlesztése után kezdték alkalmazni a temsirolimust és az everolimust. A rapamycin és a származékait az első generációs mTOR inhibitorok közé soroljuk [119, 120].

A rapamycin az FKBP-12 immunofilin fehérjével képez komplexet, mely kötődik az mTORC1 kináz FRB doménjéhez, ezzel inaktíválja az mTOR komplexet és gátolja az általa szabályozott folyamatokat: S6 kináz aktivációt teljes mértékben, míg ezzel szemben a 4E-BP1 foszforilációt csak kismértékben [121, 122, 123].

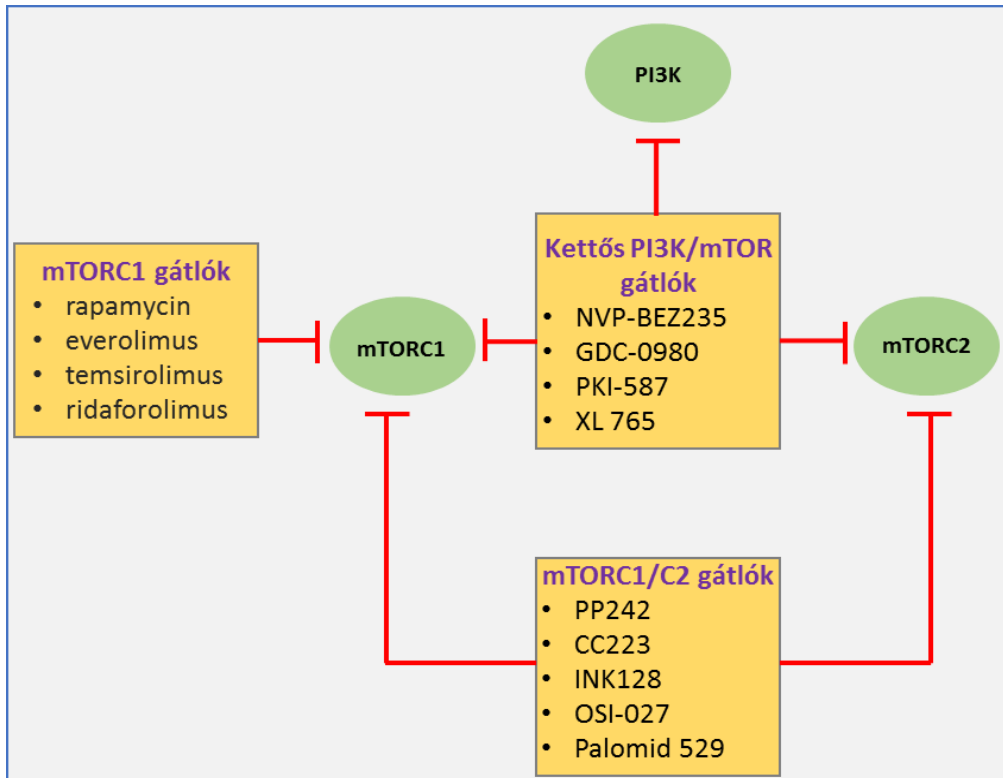
A temsirolimus és az everolimus a rapamycin észterei, melyek „prodrug” formájában kerülnek alkalmazásra. Az FDA (Food and Drug Administration) 2007-ben, ill. 2009-ben engedélyezte a két hatóanyagot előrehaladott világos sejtes vesecarcinoma kezelésére, majd az European Medicines Agency (EMA) köpenysejtes lymphomákban. Jelenleg az everolimus exemastannal (aromatáz gátló) kombinálva a menopauza utáni, hormonreceptor pozitív, HER2 negatív emlőcarcinomában másodvonalban alkalmazható szer. Az everolimust endometrium daganatokban, glioblastomákban, akut myeloid leukémiák és sarcomák egyes típusaiban másod- vagy harmad vonalbeli szerként alkalmazzák [119, 123]. Számos klinikai fázisvizsgálatot végeztek, végeznek rapalógokkal több más daganattípusban, például előrehaladott gyomorrákban, nem kissejtes tüdőrákban és hepatocellularis carcinomában is [124, 125].

A rapalógok a konvencionális kemoterápiás szerekhez képest kevesebb mellékhatással rendelkeznek. Ilyen mellékhatás a pneumonitis (páciensek közel 10%-ában), fertőzésekre való hajlam megnövekedése (immunszuppresszív hatás miatt), bőrkiütések, hiperlipidémia, hiperglikémia és stomatitis. Utóbbi a betegek felére jellemző és glükokortikoidokkal mérsékelhető [126, 127].

Az elsőgenerációs rapalógok önmagukban kismértékű gátló hatást mutattak szolid daganatokban. A gyógyszerfejlesztések után megjelentek az újgenerációs mTOR inhibitorok, melyek mindkét mTOR komplex aktivitását, illetve a PI3K/AKT/mTOR útvonal más kináz aktivitású fehérjéit is, mint például a PI3K aktivitását is csökkenthetik. Ezek kis molekulású, az útvonalban szereplő kinázok katalitikus alegységét gátló vegyületek. Mindkét mTOR komplex aktivitását gátló szerek például a PP242 (Torkinib), INK128, OSI027, amelyek hatása ATP kompetíciós hatáson alapul. A PP242 hatékonyan csökkenti a 4E-BP1 foszforilációját, amire a rapalógok nem, vagy csak kismértékben képesek [119, 123]. A PP242-t klinikai vizsgálatokban, hematológiai (myeloma multiplex) és szolid daganatokban (prostatata carcinoma, endometrium rák) tesztelik jelenleg. Mivel az mTOR fehérje FAT, FATC és kináz doménjei konzerváltak, felismerték, hogy a PI3K inhibitorok nemcsak a PI3K fehérjéhez, de az mTOR kinázhoz is kötnek, így egyszerre – más PI3K-ok mellett – képesek mindkét mTOR komplex gátlására. Ilyen gátlók az NVP-BEZ235, a XL765 és a GSK2126458, melyekkel szolid (pl. glioblastoma) és hematológiai (lymphoma) malignus daganatokban folyik klinikai vizsgálat (**11. ábra**) [119, 128, 129].

A legújabb, harmadik generációs mTOR inhibitornak tekintik a Rapalink-1-et, amit az mTOR gátló kezelésben kialakuló rezisztencia kiküszöbölésére fejlesztettek ki. A hatóanyagot a rapamycin és az MLN0128 ATP kompetitív inhibitor konjugálásával alakították ki. Egyelőre terápia rezisztens glioblastomákon vizsgálják hatását [119, 130].

Az újabb generációs mTOR gátlók hátránya, hogy jóval több mellékhatással járhatnak, mint a rapalógok. Toxicitás problémák léphetnek fel, amely miatt a kezelés felfüggesztésre kerülhet, éppen ezért a mellékhatások folyamatos monitorozása és kezelése szükséges [130, 131].



11. ábra. mTOR gátlók: mTORC1 inhibitorok, duál PI3K/mTOR gátlók és mTORC1/mTORC2 gátló hatású vegyületek és támadáspontjaik (forrás: [132] alapján készített ábra). mTORC1 inhibitor a rapamycin, everolimus, ridaforolimus és temsirolimus. A PI3K és mTOR komplexeket egyaránt gátló, duál inhibitorok például a NVP-BEZ235 és GDC-0980. Az mTORC1 és mTORC2 katalitikus doménjét gátló hatású vegyület például az PP242, CC23 és INK128 hatóanyagok.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A malignus tumorok egyik fontos jellemzője, hogy a túlélés és a proliferáció érdekében képesek megváltoztatni anyagcseréjüket. Munkámban különböző tumorsejtek metabolikus változásait (metabolikus profilját), szubsztrát hasznosítását, illetve ezekkel összefüggésben az mTOR aktivitás változásait vizsgáltam, céljaim a következők voltak:

- a. Eltérő szubsztrát hasznosítású sejtvonalak mint *in vitro* modellek segítségével metabolikus jellemzésre alkalmas analitikai és egyéb módszerek - bioenergetikai profil meghatározások beállítása
- b. Az izocitrát-dehidrogenáz 1 enzim (IDH1) mutáns HT-1080 fibrosarcoma sejtek 2-hidroxiszuccinát (2-HG) onkometabolit-termelésének vizsgálata
 - tömegspektrometriai módszerek kidolgozása, fejlesztése
 - az IDH mutáció és az mTOR aktivitás változás kapcsolatának vizsgálata
- c. mTOR gátló kezelések metabolikus és onkometabolit-termelést befolyásoló hatásainak vizsgálata *in vitro* és *in vivo* kísérletekben
- d. vad és mutáns IDH1 fehérjét overexpresszáló glioma sejtvonal pár, illetve más glioma sejtvonalak több szempontú összehasonlító vizsgálata
 - tumor növekedési sajátosságok és metabolikus jellemzők (metabolikus profil és szubsztrát hasznosítás, onkometabolit-termelés forrásának) tanulmányozása *in vitro* és betegek biopsziás mintáiban *in situ*

3. MÓDSZEREK

3.1. Vizsgált *in vitro*, *in vivo* modellek és humán szövetek

3.1.1. Sejt- és szövettenyésztés – *in vitro* vizsgálatok

Anyagcsere-vizsgálatainkban az alábbi humán tumorsejtvonalakat használtuk: HT-1080, fibrosarcoma; Oscort, osteosarcoma; MDA-MB231, BT-474, ZR-75.1 emlő carcinomák; HepG2, hepatocellularis carcinoma; U937 akut myeloid leukaemia; A-2058, melanoma; U251 MG, U87 MG, U373 MG glioma sejtvonalak. Az IDH1 mutáció tanulmányozására mutáns IDH1 R132H-t overexpresszáló U251 MG glioma sejtvonalat használtunk, amit Dr. William Leenders-től (Radboud University Medical Center, Nijmegen, Hollandia) kaptunk [133]. A sejtvonalak – az U373 MG glioma sejtvonal (amit prof. Dr. Sáfrány Géza bocsátott rendelkezésünkre) kivételével – az American Type Tissue Culture (ATCC) bankból származnak.

A sejtek tenyésztéséhez az ATCC adatlapoknak megfelelő médiumokat (RPMI 1640/DMEM high glucose) használtuk 10% főtális borjú savó (hő inaktivált FBS, Merck-Sigma Aldrich) és 0,5% gentamycin (Sandoz) vagy 100 UI/ml penicillin-streptomycin (Merck-Sigma Aldrich) antibiotikumok mellett.

A sejteket 37°C-on, 5%-os CO₂ koncentráció mellett tenyésztettük. Az adherens sejteket 2-4 naponta passzáltuk (tripszin-EDTA – Merck-Sigma Aldrich). Vizsgálatainkhoz T25, T75 tenyésztőflaskákat vagy 6-, 24-, illetve 72-lyukú plate-eket használtunk a sejtvonaltól, a kísérlet típusától, az inkubációs idejétől és a sejtszám igényétől függően. A vizsgálatokban az alkalmazott technikáktól és a sejt proliferációs tulajdonságaitól függően 2000-600.000 sejtszámokkal indítottuk az adott kísérletet.

3.1.2. Kezelőszerek, inhibitorok, metabolitok és biológiai hatásaik vizsgálata

In vitro kísérleteinkben mTOR komplex gátlókat, valamint olyan hatóanyagokat tanulmányoztunk, amelyek inhibitorai a sejtek energia-, és anyagcsere-folyamatainak pl. a glutaminolízis vagy a mutáns IDH1 enzimnek. Az alkalmazott mTOR inhibitorok: rapamycin C1 gátló (0,1-200 ng/ml, Merck-Sigma Aldrich); PP242 C1/C2 inhibitor (1 µM, Tocris, R&D Systems); NVP-BE235 – kettős PI3K és mTORC1 és C2 inhibitor (1 µM, Cayman); valamint glutaminolízis inhibitorokat: BPTES (10-20 µM Merck-Sigma Aldrich), ill. Zaprinast (1-100-300 µM Merck-Sigma Aldrich).

Metabolithatások rövid távú (24h-72h) vizsgálatában D-2-hidroxi-glutarát nátrium sóját (0,5 mM és 4 mM Merck-Sigma Aldrich) és GABA-t (5 mM, Merck-Sigma Aldrich) alkalmaztunk. Kísérleteinkben standard kemoterápiás szerként doxorubicint (50 ng/ml, Merck-Sigma Aldrich) és temozolomidot (100-300 μ M, Merck-Sigma Aldrich) használtunk. A hatóanyagoknál az alkalmazott dózist az irodalmi adatok alapján választottuk ki, de számos esetben vizsgáltuk a dózist és időfüggést is (pl. rapamycin, PP242, NVP-Bez235). Ahol oldószerként DMSO-t használtunk a hatóanyagok feloldására, ott a kontroll tenyésztőedényekhez a maximálisan alkalmazott oldószermennyiséget adtuk hozzá. Az inkubációs idők az adott kísérlettől függően 1-72 h-ig változtak. Kísérleteink során először megvártuk a sejtek letapadását (az adherens sejteknél), ezt követően médiumot cseréltünk és hozzáadtuk a vizsgálni kívánt kezelőszert.

3.1.3. Proliferáció és apoptózis vizsgálata

A sejtek proliferációjának vizsgálatát mitokondriális reduktáz aktivitáson alapuló Alamar blue teszttel végeztük. Az Alamar blue oldatot (resazurin, Thermo Fisher Scientific) 10 μ g/ml végső koncentrációban használtuk, a 96-lyukú plate-ken 4 órán keresztül. A metabolikusan aktív sejtek átalakítják a reagenst, így a festék színe a sejtek proliferációjától függően változik. Fluoriméterrel határoztuk meg a minták fluoreszcencia értékeit (570-590 nm, Ascent szoftver; Fluoroskan Ascent FL, Labsystems). Az eredményeket a kezeltlen kontroll sejtek %-ában adtuk meg.

Az apoptotikus sejtek százalékos arányát áramlási citometriával határoztuk meg csoportunk korábban közölt módszere alapján [134]. Az egysejt szuszpenziós mintákat (tripszin-EDTA-val, mint passzáláskor) 70% etanolban fixáltuk, majd -20°C -on tároltuk. A méréseket megelőzően lúgos extrakciót (200 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4), RNáz (1 μ g/100 μ l; Merck-Sigma Aldrich) emésztést és propidium-jodid festést (10 μ g/ml, Merck-Sigma Aldrich) végeztünk. Mintánként 10-20.000 eseményt mértünk FL2, FSC tartományban áramlási citométerrel (BD Biosciences), majd az adatokat Winlist (Verity Software House) programmal értékeltük ki.

3.1.4. Xenograft modell létrehozása HT-1080 fibrosarcoma sejtekkel – *in vivo* vizsgálatok

8-10 hetes, 20-23 g-os SCID egerekbe *subcutan* 2×10^6 HT-1080 tumorsejtet oltottunk. A tumorok további egerekbe való átoltása után a tapintható tumorok megjelenését követően kezdtük meg a kezeléseket. A kezelt csoport 3 mg/egér testtömeg (kg) mennyiségű rapamycint (Rapamune 1 mg/ml, Wyeth Europa) kapott heti három alkalommal három hétig szájon át (*per os*) szondázással. A kontroll csoport fiziológiás sóoldatot kapott. A testtömeget és a tumor méretét rendszeresen mértük. A tumortérfogatot az alábbi képlet alapján határoztuk meg: $\pi/6 \times (2 \times \text{rövidebb átmérő} + \text{hosszabb átmérő}) / 3$.

A kísérlet végén a tumorok tömegét mértük, majd 4%-os formalinban fixáltuk. Minden tumor egy kis részét (80-180 mg tumor) folyékony nitrogénbe is lefagyasztottuk és -80°C -on tároltuk az LC-MS mérésig. A formalin-fixált mintákból paraffinba ágyazott blokkok, majd metszetek készültek az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz. Az *in vivo* vizsgálatokat intézetünk állatházának PEI/001/2457-6/2015, ill. PEI/001/1733-2/2015 azonosítójú engedélyeinek megfelelően végeztük.

3.1.5. Szöveti multiblokk (TMA) készítése humán glioma biopsziás mintákból – *in situ* vizsgálatok

Humán vizsgálatainkhoz 47 glioma biopsziás mintából szöveti multiblokkokat (TMA) készítettünk. Eseteink megoszlása: astrocytoma $n=14$, oligodendroglioma $n=14$, glioblastoma $n=19$; nem: nő $n=23$, férfi $n=24$; WHO grádus: II $n=9$, III $n=19$, IV $n=19$; IDH1 R132H mutáció - pozitív $n=32$, negatív $n=15$ szerint. Kontrollként az agy három különböző régiójából származó területet, továbbá veseszövetet használtunk [135].

3.2. Expressziós és mutációs vizsgálatok

3.2.1. Western blot vizsgálatok

A sejtekből származó minták fehérje expresszióját Western blot technikával vizsgáltuk. A sejteket SDS mintapufferben (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% NP40; 1 mM PMSF; 10 mM NaF; 0,5 mM nátrium-vanadát; 10 mM proteináz koktél és 10% glicerol) lizáltuk, majd 20 perc vortexelés után jégen inkubáltuk.

Centrifugálást (15.000 g, 20 perc) követően a felülúszó fehérjetartalmát Bradford módszerrel fotométerrel mértük. Egyenlő mennyiségű – 15-20 µg – fehérjét 2-merkaptoetanol Laemli puffer (BioRad) 1:20 elegyével 5 percig forraltuk (GLUT1 kimutatásakor ezt a lépést az antitest gyártói leírásának megfelelően elhagytuk), majd 8-12,5%-os SDS gélen futtattuk. PVDF membránnal (BioRad) nedves blottolást, majd 5%-os tejporos (PBS-ben oldott tejpor) (BioRad) blokkolást végeztünk. Ezt követően 4°C-on éjszakán át az alábbi ellenanyagokkal inkubáltunk: anti-foszfo-mTOR (Ser2448, 1:1000, #2971; Cell Signaling Technology – CST), anti-foszfo-S6 (Ser 235/236, 1:1000, #2211; CST), anti-Rictor (1:1000, #2140; CST), anti-Raptor (1:500, #89603; Novus), anti-mTOR (1:1000, #2938; CST), anti-S6 (1:1000, #2317; CST), anti-laktát-dehidrogenáz A (1:1000, #3582; CST), anti-glutamináz (1:1000; #156876; Abcam), anti-GLUT1 (1:1000, #652; Abcam), anti-β-F1-ATPáz (1:2000, #14370; Abcam), anti-GAPDH (1:2500, mca2427; Serotec), anti-pan-Akt (1:1000, #2920; CST), anti-foszfo-(Ser473)-Akt 1 (1:2000, #4060; CST), anti-foszfofruktokináz-P (1:1000, #8164; Abcam), anti-hexokináz-2 (1:1000, #2867; CST) anti-ASCT2 (1:2000, #A304-353A; Bethyl), anti-szukcinát szemialdehid-dehidrogenáz – SSADH (1:1000, #129017; Abcam) és anti-GABA transzporter 1 (1:500, #426; Abcam). Az előhíváshoz Vectastain Elite ABC másodlagos előhívó kitért (Vector) és kemilumineszcens (ECL, ThermoFisher) rendszert; KODAK Image Station 4000 MM (Eastman Kodak) vagy C-Digit kemilumineszcens előhívó készüléket használtuk. Loading kontrollként anti-β-aktin monoklonális egér elsődleges (#A228; Merck-Sigma Aldrich) és tormaperoxidáz (HRP) konjugált anti-egér IgG-vel (CST) másodlagos ellenanyaggal is végeztünk reakciót.

3.2.2. Immuncitokémiai és immunhisztokémiai vizsgálatok

Az IDH1 R132H mutációt hordozó U251 MG glioma sejtekben a mutációt immuncitokémiai festéssel igazoltuk. A cytospin lemezeket citocentrifugálás (500 rpm, 5 perc) után formalinban fixáltuk, majd a diagnosztikai protokoll szerint anti-humán IDH1 R132H (1:80, H09 clone; Dianova) festés készült.

A humán glioma TMA és HT-1080 xenograft tumorszövetéből származó metszeteket deparaffináltuk, majd endogén peroxidáz blokkolást követően 0,01 M-os nátrium-citrát (pH 6) pufferben elektromos kuktával feltártuk. A metszeteket lószérumos (3%)

pufferben blokkoltuk és inkubáltuk elsődleges ellenanyaggal 4°C-on egész éjszakán át. HT-1080 xenograft mintákon anti-p-S6 (1:100, #2211; CST), anti-p-mTOR (1:100, #2971; CST), anti-glutamináz (1:200, #156876; Abcam) and anti-LDH-A (1:400, #3582; CST) ellenanyagokat; míg TMA vizsgálatokban anti-SSADH (1:500, #129017; Abcam) ellenanyagot alkalmaztunk. A reakció detektálásához Novolink (Novocastra) rendszert használtunk, DAB/hidrogén-peroxid kromogén/szubsztrát előhívó rendszerrel. Háttérfestésként hematoxilin festést használtunk [136].

A humán biopsziás minták 3DHistech Panoramic Viewer program segítségével H („histo”)-score szerint (0-300-as skálán) értékeltük két független patológus szemikvantitív analízise alapján. A H-score értékeket a festődés intenzitás értékéből (0, 1+, 2+ vagy 3+) és a pozitívan festődő sejtek százalékának szorzatából számítottuk. A végső H-score értékeket az egy csoportba tartozó minták átlagából adtuk meg. A humán TMA vizsgálatban az SSADH expressziót alacsonynak (H-score 0-149) vagy magasnak (H-score 150-300) definiáltuk.

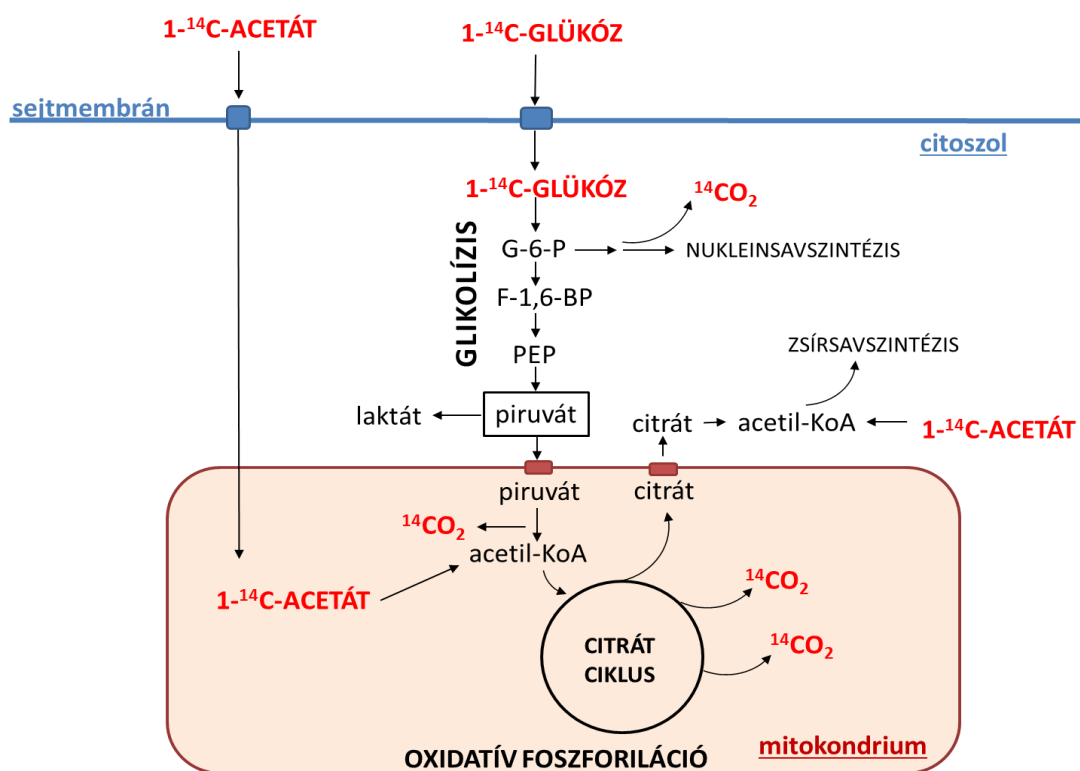
3.2.3. IDH mutáció igazolása Sanger szekvenálással

IDH1 és IDH2 gén mutációinak vizsgálatában a DNS-t izoláltunk rutin DNS izoláló kittel (Roche), majd polimeráz láncreakcióban amplifikáltuk a megfelelő DNS szakaszokat (AmpliTaqGold Master Mix) az alábbi primerek segítségével: IDH1 4. exonjára tervezett primerek (forward: AAAACTTTGCTTCTAATTTTCTCTTT, reverz: ACATACAAGTTGGAAATTTCTGG); IDH2 4. exonjára tervezett primerek (forward: TCTAGACTCTACTGCCTTCCTC, reverz: GTCAGTGGATCCCCTCTCCA). Az amplifikáció után tisztítást (ExoSAP-IT kit – Affimetrix) követően a direkt szekvenálást (BigDye 3Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Genetic Analyser 3500 – Applied BioSystem) a Molekuláris Onkohematológia Laborban végezték.

3.3. Anyagcsere-folyamatok vizsgálatai

3.3.1. Tumorsejtek szubsztrát oxidációjának vizsgálata ^{14}C -jelzett acetát és glükóz tápanyaggal

A vizsgálathoz használt tumorsejteket speciális, energiaszubsztrát szegény (glükóz, glutamin és acetát mentes) DMEM D5030 médiumba helyeztük. Médiumcsere után tumorsejteket $0,2 \mu\text{Ci/ml}$ nátrium- $[1-^{14}\text{C}]$ -acetáttal vagy $[1-^{14}\text{C}]$ -glükózzal inkubáltuk. Az áramlási kamrában ezt követően meghatároztuk az azonos légköri nyomással áthaladó CO_2 mentes levegőbe a sejtek által kilélegzett CO_2 radioaktivitását (**12. ábra**); a kamra falához illesztett alacsonyabb nyomású gyűjtőkamrába irányított CO_2 -ot egy alkalikus filter kártya (MTA Izotóp Intézet Zrt. biztosította) fogta fel. Az egy órás sejtes vizsgálatokban a médiumban oldott CO_2 -ot citromsavval 60°C -on további inkubálással szabadítottuk fel és így kötöttük az alkalikus kártyán. A kártya radioaktivitását, a beütések számát ikercsatornás Geiger-Müller számlálóval határoztuk meg.



12. ábra. ^{14}C -jelölt glükóz és acetát energetikai szubsztrátok utáni CO_2 termelés főbb útvonalainak vázlat. ^{14}C -jelzett energiaszubsztrátokból az ábrán bemutatott bioenergetikai folyamatokban keletkező $^{14}\text{CO}_2$ radioaktivitásából meghatározható a

szubsztrátfelhasználás hatékonysága. A CO₂ keletkezésének főbb lehetőségei a sejtekben: A) glükóz-6-foszfát (G-6-P) direkt oxidációjából a pentóz-foszfát-úton a 6-foszfoglükonát-dehidrogenáz enzim katalízisével; B) a piruvát acetil-KoA-vá való dekarboxileződésével piruvát-dehidrogenáz enzimkomplexszel; C) a citrát-ciklusban az izocitrát-dehidrogenáz és az α -ketoglutarát-dehidrogenáz reakciójában. F-1,6-BP: fruktóz-1,6-biszfoszfát

3.3.2. Metabolitok extrakciója, majd mennyiségük meghatározása tömegspektrometriai módszerekkel

A glikolízis és a citrátkör metabolitjait, valamint az onkometabolitokat a sejtekből extraháltuk. Az extrakciót szubkonfluens sejtekből és xenograft tumorszövetből – szövetek esetében folyékony nitrogénben való porítása után – végeztük 4°C-on. Az extrakció során először a sejteket folyékony nitrogénnel fagyasztottuk („quenching”), majd metanol-kloroform-víz (9:1:1) oldattal lizáltuk. A sejtízátumból centrifugálással készítettük a felülúszót és felhasználásig -80°C-on tároltuk.

A következő metabolitokat határoztuk meg kvantitatívan: laktát, citrát, szukcinát, malát, fumarát és 2-hidroxiglutarát 1-10-50-100-200 μ M standard hígítási sorok felhasználásával (standard törzsoldatok készítéséhez szükséges anyagokat a Merck-Sigma Aldrichtól szereztük be). A sejtek metabolit koncentrációját standard kalibráció segítségével ng/1 millió sejtre vagy ng/10 mg szövetre vonatkoztatva adtam meg.

Vizsgálatainkban több LC-MS módszer használatára és fejlesztésére nyílt lehetőségünk, ahol a metabolit extrakciós eljárások mindegyikben azonosak voltak.

Az első mérésekben Dr. Szoboszlai Norbert és munkatársai által beállított LC-MS analízist alkalmaztuk. A mérést az MTA-TTK Tömegspektrometriai Osztályán végezték (Waters Acquity folyadékkromatográf és Waters Micromass Quattro Micro tömegspektrométer – Waters Corporation, Milford MA, USA) porózus grafit oszlopos (Hypercarb – Thermo Fisher Scientific) elválasztással, metanol víz eluenssel és hangyasavval (utóbbit mint elektronikus módosító alkalmaztuk) történt, amely során negatív elektropray ionizálást, analizátorként pedig tripla kvadrupólt alkalmaztunk. A mérés folyamata MRM („multiple reaction monitoring”) módban történt [137].

Egy másik alkalmazott módszerben Jaitz és munkatársai által leírt méréseket végeztünk, amelyben módosításokat tettünk [138]. A metabolitokat származékképzéses

módszerrel vizsgáltuk. Közvetlenül a mérés előtt a mintákat 40°C-on fokozatosan szárítottuk, melyeket trimetilklórszilán és 3-nitrobenzil alkohol 3:5 arányú elegyével (Merck-Sigma Aldrich) ultrahanggal rázattuk, majd 70°C-on inkubálás után 0,2 M-os ammónium-hidrogénkarbonáttal állítottuk le a származékképzéses reakciót. A mérést az MTA-TTK Tömegspektrometriai Osztályán mértük, az előbbieken leírtak megfelelően. Származékképzés után az alábbi tömegszámokat kaptuk: laktát 243, szukcinát 406, malát 422, fumarát 404, 2-hidroxi-glutarát 436, citrát 612.

A harmadik módszerben Perkin-Elmer Flexar FX10 ultra-performance folyadékkromatográfot Sciex 5500 QTRAP tömegspektrométerrel alkalmaztunk. A fordított fázisú kromatográfiás elválasztást Phenomenex Luna Omega C18 oszloppal végeztük, (Gen-Lab, Budapest). Eluensként 0,1% hangyasavat tartalmazó vizet (A) és metanolt (B) használtunk gradiens programmal. Az oszlop hőmérsékletét a kísérlet ideje alatt 35°C-on tartottuk. A tömegspektrométer negatív elektropray ionizációval működött. A mérést MRM módban végeztük.

3.3.3. Szubsztrát hasznosítás vizsgálata LC-MS-sel ¹³C stabil izotópjelölés után

Annak meghatározására, hogy a különböző tumorsejtek mely bioenergetikai szubsztrátot hasznosítják bioenergetikai folyamataikban stabil izotóp jelöléses technikát alkalmaztunk. Kísérleteinkben a már leírt előkészítési eljárással extraháltuk, majd az LC-MS módszerrel mértük a metabolitok koncentrációját és a ¹³C atomok beépülésének mértékét a különböző intermedierekbe.

Vizsgálatainkban a jelölésekhez 10 mM U-¹³C-glükóz, illetve 4 mM U-¹³C-glutamin vagy 10 mM 2-¹³C-acetát (Cambridge Isotope) szubsztrátokat adtunk szubkonfluens tenyészetekhez DMEM D5030 tápfolyadékba keverve, a jelölés egy órán át tartott 37°C-on 5% CO₂ termosztátban [137, 139]. A 24 órás jelöléses vizsgálatainkban mindig DMEM D5030 médiumot alkalmaztunk, de tekintettel a hosszú inkubációs időtartamra, adott jelölt szubsztrát mellett 10% savót, antibiotikumot és jelölésnél jelöletlen L-glutamint (4 mM) és/vagy D-glükózt (10 mM) is használtunk.

3.3.4. Oxigénfogyasztás és extracelluláris acidifikáció mérése Seahorse technikával

A glioma sejtvonalak (U251 MG, U87 MG, U373 MG) oxigénfogyasztását, extracelluláris savasodását és szubsztrát oxidációját Seahorse módszerrel vizsgáltuk.

Valós idejű oxigénfogyasztási ráta („oxygen consumption rate” – OCR) és extracelluláris acidifikációs ráta („extracellular acidification rate” – ECAR) szimultán mérése Seahorse XF96 Analyzer készülékkel (Agilent Technologies) történt [140-142]. Az OCR a mitokondriális aktivitással, az ECAR a sejtek glikolitikus tevékenységével arányos.

A glioma sejteket 24 órával a mérés előtt 96-os Seahorse plate-re helyeztük saját teljes médiumaikban. A mérés kezdetekor a médiumot DMEM D5030 (pH 7,4) tápfolyadékra cseréltük. Az alap OCR és ECAR értékeket XF96 Analyzer Software segítségével határoztuk meg 1-1,5 óra inkubációs idő után. Ezt követően az alábbi energiaszubsztrátok oxidációját mértük pH 7,4-en: glükóz 10 mM, glutamin 25 mM, citrát 5 mM, GABA 5 mM, laktát 5 mM, malát 10 mM, acetát 10 mM és glutamát 5 mM. A szubsztrátok oxidációs vizsgálata során metabolikus inhibitorokat/modulátorokat injektáltunk a sejtekhez a mitokondriális és glikolitikus funkciók részletesebb tanulmányozásához (oligomycin 2 μ M – légzési lánc komplex V gátló; 2,4-dinitrofenol - DNP 100 μ M – mitokondriális szétkapcsoló szer és antimycin A – légzési lánc komplex III gátló + rotenon 1-1 μ M – légzési lánc komplex I gátló).

3.4. Statisztikai analízis

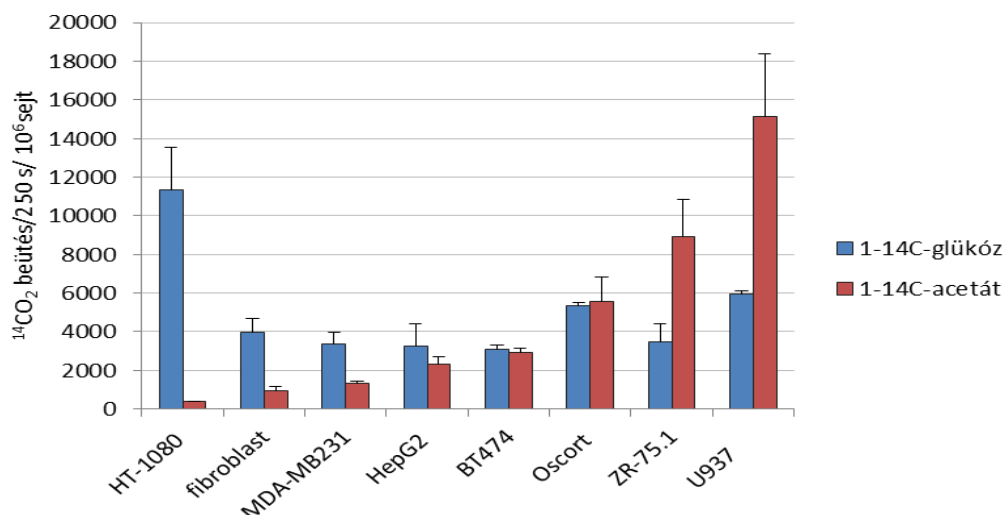
Az adatok elemzése során azok számtani átlaga és standard deviációja került kiszámításra. Minden kísérletben legalább 3 független biológia mintából indultunk ki az alkalmazott módszertől függően. Az *in vitro* és *in vivo* kezelések során kétmintás t-próbával és egyszempontos variancia-analízissel (ANOVA post-hoc Tukey's teszt) számoltuk ki a szignifikancia értékeket ($p < 0.05$). A számításokat IBM SPSS Software (version 22, SPSS Incorporation), valamint PAST v3.05 programmal (PAST letölthető szoftver <http://folk.uio.no>) végeztük. A humán glioma biopsziás minták nem-parametrikus H-score eredményei és a klinikopatológiai paraméterek összefüggéseinek statisztikai analízisére Mann-Whitney U és Kruskal-Wallis teszteket alkalmaztuk, ugyanacsak az SPSS szoftvercsomagból. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0,05$ értéket tekintettük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Bioenergetikai vizsgálatok *in vitro* sejtvonalakban

4.1.1. Különböző tumor sejtvonalak ¹⁴C-glükóz és -acetát szubsztrát hasznosításának jellemzése

Tápanyaghiányos médiumban 1-¹⁴C-glükóz és 1-¹⁴C-acetát szubsztrátok hozzáadása után keletkező (légzési) ¹⁴CO₂ mennyiségét hasonlítottuk össze különböző humán tumorsejtvonalakban és fibroblastokban. A tumorsejtekben a glükóz oxidációja a glikolízisben, pentóz-foszfát-út első szakaszában és a mitokondriumban (citrátkör, oxidatív foszforiláció) is történhet, acetátból azonban elsősorban a mitokondriális oxidáció során keletkezik CO₂. A vizsgált sejtvonalak nagyobb része (4 esetben a 7-ből; a glükózt jelentősebb mértékben oxidálta, mint az acetátot (**13. ábra**). A hét tumorsejtvonal glükóz oxidáló képessége kisebb egyedi különbségeket mutatott (~2000-13000 beütés/250 s/1 millió sejt), míg jelentős eltérést tapasztaltunk az acetát oxidációban (~700-18000 beütés/250 s/1 millió sejt). Ezek alapján feltételezhető, hogy a glükóz/acetát oxidáció hányadosban mutatkozó, a sejtvonalakat jellemző különbségekért elsősorban a tumorsejtek eltérő acetát hasznosítása, az ezzel összefüggő mitokondriális funkciók eltérései állhatnak. A legnagyobb különbséget a két szubsztrát oxidációjának arányában a HT-1080 fibrosarcoma és a ZR-75.1 emlőcarcinoma sejteknél tapasztaltunk, ezért részletes bioenergetikai összehasonlító vizsgálatokat végeztünk ebben a két sejtvonalban.

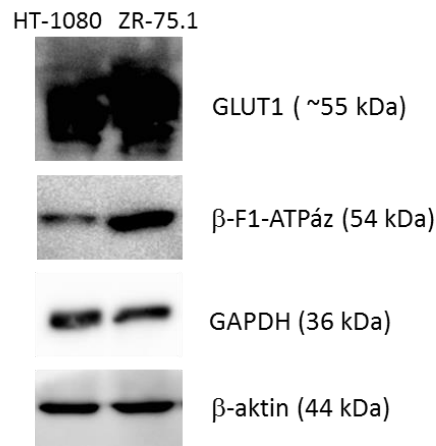


13. ábra. Humán tumorsejtvonalak és izolált normál humán sejtek CO₂ termelése 1-¹⁴C-jelölt glükózból és 1-¹⁴C-Na-acetátból *in vitro*. HT-1080: fibrosarcoma (humán); Oscort, osteosarcoma (humán); MDA-MB231, BT-474, ZR-75.1, emlőcarcinomák (humán); HepG2, hepatocellularis carcinoma (humán); U937, monocytás leukaemia (humán); ill. fibroblastok (humán).

4.1.2. Bioenergetikai útvonalakban fontos enzimek, transzporterek expressziójának jellemzése

A glükóz/acetát oxidációs arányok további tanulmányozása során az energiatermelésben, anyagcserében résztvevő enzimek expresszióját vizsgáltuk meg a HT-1080 és ZR-75.1 sejtvonalakon. A GLUT1 (glükóz transzporter 1) szállító fehérje expressziója mindkét sejtben magasnak bizonyult. A glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PDH), gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) és β -F1-ATPáz korábbi mRNS expresszió (a real-time PCR adatok nem kerülnek bemutatásra – Dr. Fullár Alexandra eredményei) vizsgálata alapján felmerült, hogy a két sejt előbbi eltéréseinek hátterében előbbi enzimek expressziós különbségei állhatnak. A β -F1-ATPáz fehérje mennyiségi különbségeit sikerült fehérje szinten is igazolni, a ZR-75.1 sejtek magasabb β -F1-ATPáz expresszióval rendelkeznek, mint a HT-1080 sejtek. A GAPDH és β -F1-ATPáz fehérje expresszió aránya a glikolízis és az oxidatív foszforiláció arányára utalhat ebben a vizsgálatban, és alátámasztja a HT-1080 magasabb glikolítikus aktivitását az ZR-75.1 tumorsejtekhez képest. Utóbbi sejtekben a magas β -F1-ATPáz

expresszió a mitokondriális oxidációs folyamatok és a citrátkör jelentős (a HT-1080-énál mindenképpen jelentősebb) funkcióit mutatják (**14. ábra**).



14. ábra. Bioenergetikai folyamatok egyes enzimeinek expresszió vizsgálata Western blottal HT-1080 és ZR-75.1 sejtvonalakban. A glükóz transzporter 1 (GLUT1) és GAPDH enzimek (glikolítikus), valamint a β -F1-ATPáz (oxidatív foszforilációban részt vevő) jelentős expressziójának kimutatása és mennyiségének összehasonlító vizsgálata a két eltérő metabolikus aktivitású sejtvonalban.

4.1.3. Glükóz hasznosítás vizsgálata ^{13}C -jelölt glükóz jelölést követő LC-MS méréssel

DMEM D5030 glükóz- és glutamin mentes tápfolyadékban 1 óráig U- ^{13}C -glükóz mellett tartott sejtek intracelluláris metabolit mennyiségét és a meghatározott metabolitok (TCA metabolitok és a laktát) ^{13}C jelölődésének mértékét határoztuk meg LC-MS módszerrel. A ^{13}C jelölt szénatomok beépülésének mértéke, a sejt adott bioenergetikai folyamatainak intenzitásával arányosan változik: a HT-1080 fibrosarcoma sejtekben a glükózból származó ^{13}C atomok elsősorban a laktátban és a glükóz-6-foszfátban jelentek meg, a TCA intermedierekben kevésbé. Glükózból a malátba 2-3 ^{13}C atom beépülését figyeltük meg a HT-1080 sejtekben, míg a ZR-75.1 sejtekben 4 ^{13}C -et is. Ezek alapján a HT-1080 sejtek a glükózt a TCA ciklusban kevésbé hasznosítják, mint a ZR-75.1 sejtek. Előbbi különbség szemléltetésére, a glikolízis és az oxidatív foszforiláció arányának jellemzéséhez a sejtek intracelluláris ^{13}C -laktát/ ^{13}C -malát arányát adtuk meg. Ez a HT-1080 sejtekben 13,74, míg a ZR-75.1-ben 1,17 volt,

ami a HT-1080 sejtek jelentős glikolitikus eltolódását mutatja. A **13. ábrán** bemutatott sejtvonalak közül a ZR-75.1-hez hasonlóan jelentős acetát hasznosítással rendelkező U937 sejtekben előbbihez hasonló alacsony ^{13}C -laktát/ ^{13}C -malát arányt (0,87) mutattunk ki. Adataink azt mutatják, hogy ezzel a vizsgálattal a magas mitokondriális oxidációval rendelkező sejtek, illetve a sejtek glikolitikus-TCA oxidációs eltolódásai jól jellemezhetők.

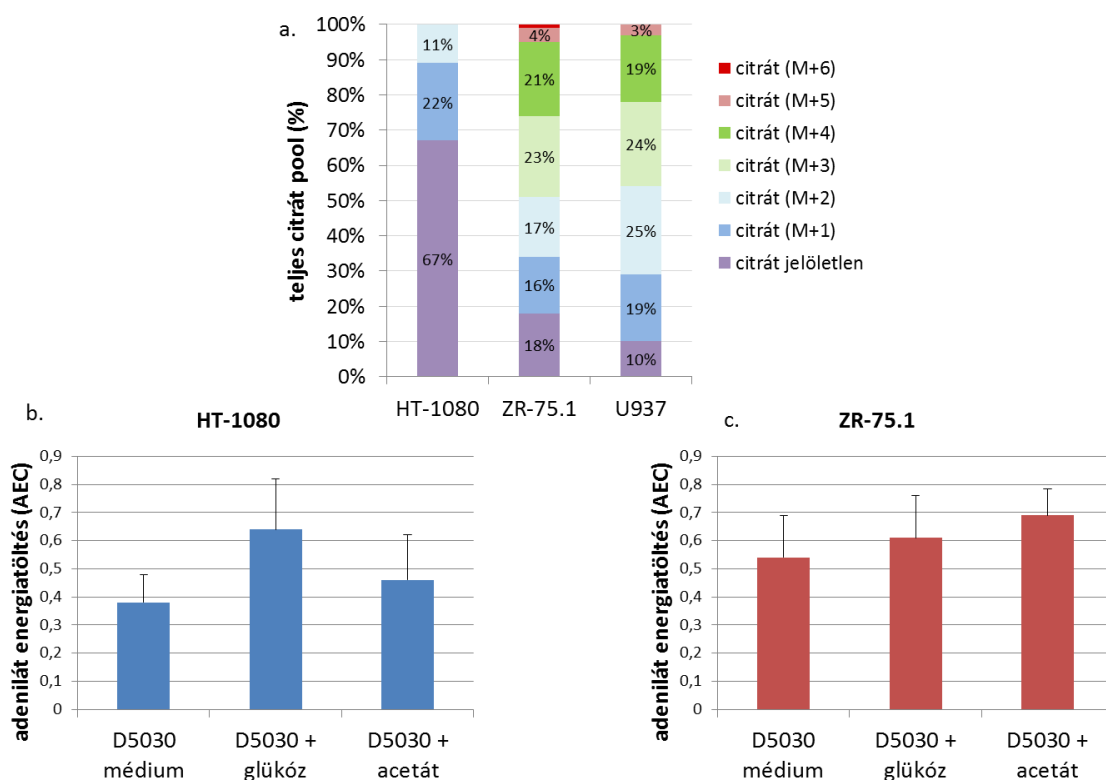
4.1.4. Citrátkör működésének vizsgálata ^{13}C -jelölt acetáttal

Az acetyl-KoA második szénatomja az, amely a citrátkörbe belépve akár több ciklusban épülhet be a citrátba, így a $2\text{-}^{13}\text{C}$ -acetát alkalmazásával a citrátköri metabolitokba beépülő acetát szubsztrát forrásokból származó ^{13}C -atomok sorsát követhetjük nyomon. Ezzel a módszerrel az adott idő alatt beépülő és a citrátban vagy további TCA metabolitokban feldúsuló (egyre nagyobb arányban megjelenő többszörösen jelölt ^{13}C -atom tartalmú metabolitok) jelölések mennyisége és a jelölt metabolitok arányának emelkedése utalhat a citrát-ciklus intenzív működésére. A sejteket DMEM D5030 médiumban egy óráig jelöltük, majd meghatároztuk a jelöletlen (csak ^{12}C atomokat tartalmazó citrátot) és a ^{13}C -mal (akár többszörösen) jelölt (1-6 jelölés lehetséges) intracelluláris citrát mennyiségét LC-MS-sel. HT-1080 fibrosarcoma sejtekben 1-2 beépülést figyeltünk meg, míg a ZR-75.1 emlőcarcinoma sejteknél 6 ^{13}C -mal jelölt citrátot is detektáltunk. Ezek az eredményeink megerősítik a glükóz jelölés alapján feltételezett intenzív mitokondriális működést a ZR-75.1 sejtekben; illetve annak hiányát, valamilyen mitokondriális funkció károsodását a HT-1080 sejtekben. Az U937 monocytás leukaemia sejtekben elvégzett hasonló vizsgálatainkban 1-5 ^{13}C beépüléssel az összes citrát 88%-a jelölődött (jelöletlen 11%; 1x ^{13}C - 19%, 2x ^{13}C - 24%, 3x ^{13}C - 24%, 4x ^{13}C - 19%, ill. 5x ^{13}C - 3%), ami szintén igazolta a ZR-75.1 és U937 sejtek bioenergetikai hasonlóságát (**15. a. ábra**).

4.1.5. Glükóz és acetát szubsztrát hatása az adenilát energiatöltésre

Kísérleteinkben glükóz és acetát jelenlétében és hiányában is vizsgáltuk az adenilát energiatöltést (AEC) a HT-1080 és a ZR-75.1 sejtvonalakban, DMEM D5030 médiumban (glükóz-, glutamin- és savómentes körülmények). Az adenilát energiatöltés a sejtek kémiai energia tartalmát mutatja (AEC=ATP + 0,5 ADP/ATP + ADP + AMP).

Tápanyag dús médiumban tartott sejtekhez (AEC=0,75-0,85) viszonyítva D5030 DMEM médiumban csökkent értékeket mértünk, ez a csökkenés a HT-1080 sejtekben fokozottabb volt (0,38), mint a ZR-75.1 sejtekben (0,54). Éhezés mellett a HT-1080 sejtekben a hozzáadott glükóz, míg a ZR-75.1 sejtekben a hozzáadott acetát emelte a mérhető AEC értéket. Ezek az adatok is alátámasztják, hogy a HT-1080 glükózt mint szubsztrátot hasznosítja nagyobb mértékben (az acetátot kevésbé), ellentétben a ZR-75.1 sejtekkel, ahol a szubsztrát hasznosítás jóval kiegyensúlyozottabb, sőt az acetát hasznosítás jelentősebb (15. b.-c. ábra).

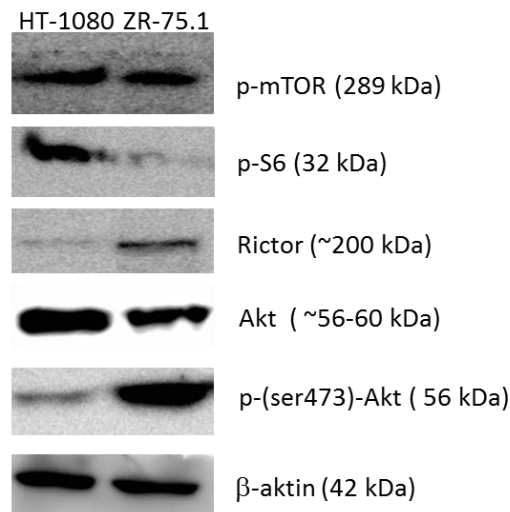


15. ábra. ^{13}C atomok citrátban történő beépülése $2\text{-}^{13}\text{C}$ -acetát-jelölést követően HT-1080, ZR-75.1 és U937 sejtekben (a.), ill. glükóz és acetát szubsztrát hatása az adenilát energiatöltésre HT-1080 (b.) és ZR-75.1 sejteken (c.). 10 mM $2\text{-}^{13}\text{C}$ -acetáttal (DMEM D5030 médiumban) inkubáltuk a sejteket egy óráig, majd az intracelluláris metabolitokat extraháltuk, a különböző tömegszámú szénizotópot (^{12}C és/vagy ^{13}C) tartalmazó metabolitok mennyiségi meghatározását, a ^{13}C atomok citrátba épülését határoztuk meg LC-MS-sel. A HT-1080 tumorsejtekben csak 1-2, az U937 sejtekben 5, míg a ZR-75.1 sejtekben akár 6 ^{13}C -atom beépülését detektáltuk a citrátban (a). Glükóz és acetát hozzáadása után, azok hiányában és a két szubsztrát kombinált

alkalmazásával vizsgáltuk az adenilát energiatöltést (AEC), amely a sejtek energia kapacitását mutatja meg ($AEC = \frac{ATP + 0,5 ADP}{ATP + ADP + AMP}$) a HT-1080 (b.) és ZR-75.1 (c.) sejtvonalonban, DMEM D5030 médiumban.

4.1.6. A vizsgált bioenergetikai útvonalak lehetséges szabályozói

A HT-1080 és a ZR-75.1 sejtek összehasonlításakor az energia-anyagcsere szabályozásában is kiemelt jelentőségű mTOR komplexek szerepét is tanulmányoztuk. Az mTORC1 és az mTORC2 komplexek elemeit és aktivitásukat jellemző fehérjék expresszióját vizsgáltuk. A HT-1080 sejtekben magas p-mTOR, p-S6 és relatíve alacsony Rictor expresszió volt kimutatható, ami az mTORC1 komplex mennyiségének és aktivitásának dominanciájára utal. A ZR-75.1 sejtekben magas p-mTOR, alacsony p-S6 és magas Rictor expresszió volt jellemző, ami elméletileg alacsonyabb mTORC1 és magas mTORC2 aktivitással hozható összefüggésbe. Akt expressziós különbségek a sejtek között nem voltak, de a p-szerin473-Akt mennyisége szignifikánsan magasabb volt ZR-75.1 sejtekben, ami a már említett magas mTORC2 aktivitásra utalhat (16. ábra).



16. ábra. mTORC1 és C2 komplex mennyiségét és aktivitását jellemző fehérjék expressziójának összehasonlítása Western blottal HT-1080 és ZR-75.1 sejtekben.

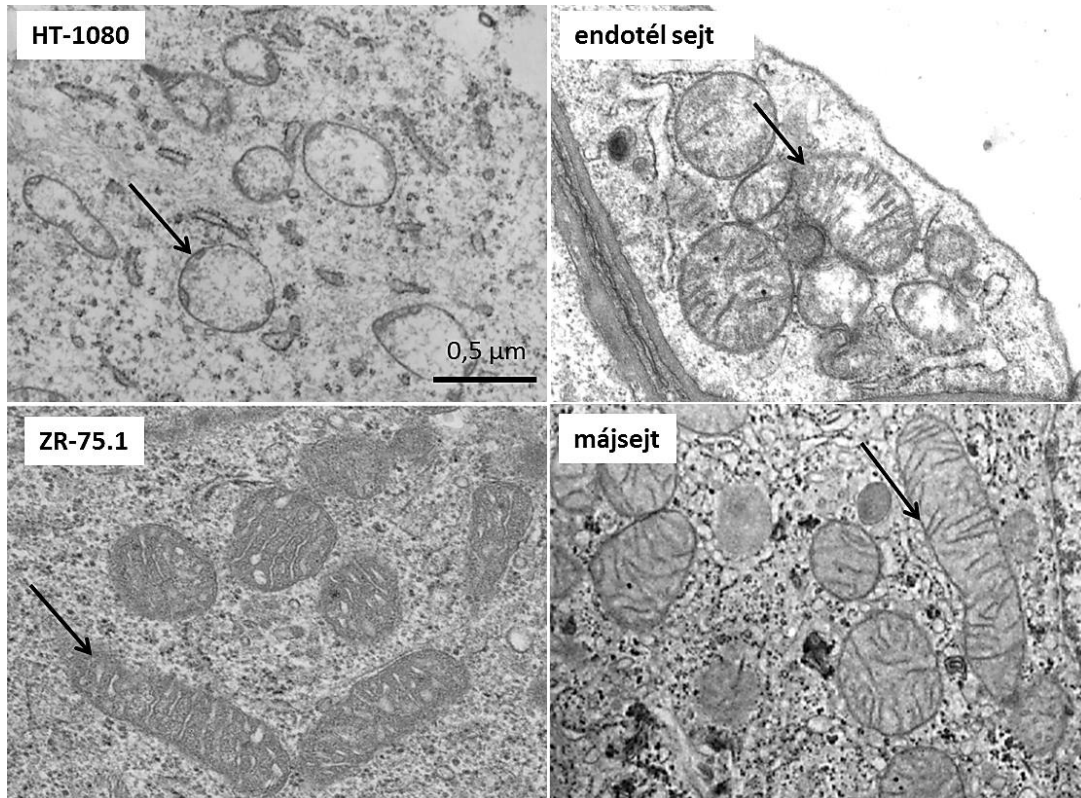
p-mTOR: aktív mTOR kináz; p-S6: foszforilált riboszomális S6 - mTORC1 aktivitásával összefüggő fehérje; Rictor: mTORC2 specifikus struktúrfehérje; p-(ser473)-Akt: mTORC2 komplex aktivitásának marker fehérjéje. Az mTORC1

aktivitására utal a nagy mennyiségű p-mTOR és pS6 mellett az alacsony Rictor expresszió és a p-(ser473)-Akt relatív alacsony mennyisége (HT-1080 sejtek). Míg a ZR-75.1 sejtekben magas p-mTOR és Rictor expressziót tapasztaltunk, ami az mTORC2 komplex nagyobb mennyiségére utal, továbbá a párhuzamosan szintén nagy mennyiségű p-(ser473)-Akt és az alacsony p-S6 expresszió viszont a C2 komplex magasabb, illetve az mTORC1 relatív alacsony aktivitásának a jele.

4.2. 2-hidroxioglutarát termelés és az mTOR aktivitás kapcsolata

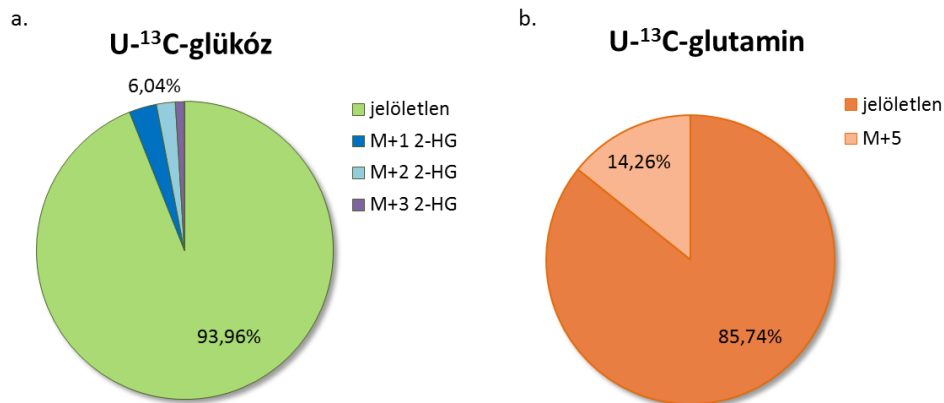
4.2.1. HT-1080 fibrosarcoma sejtek 2-hidroxioglutarát onkometabolit-termelése

A metabolikus karakterizálása során megállapítottuk, hogy HT-1080 fibrosarcoma sejtek jelentős glikolitikus aktivitást és károsodott mitokondriális funkciókat mutatnak. A mitokondriális károsodást támasztják alá a HT-1080 sejt vonal xenograftjának elektronmikroszkópos felvételei is, ahol csökkent számú és sérült morfológiájú mitokondriumok figyelhetők meg (**17. ábra**). Ezzel szemben a ZR-75.1 sejtek mintáiból készült elektronmikroszkópos felvételek a normál sejtekéhez hasonló, ép struktúrájú mitokondriumokat mutatnak. LC-MS metabolit koncentráció mérések közben egy korábban nem azonosított nagy intenzitású csúcsot figyeltünk meg a HT-1080 fibrosarcoma sejtek kromatogramján. A csúcs a 2-hidroxioglutarát onkometabolit sejtbeni felhalmozódásának jele (~18 nmol/10⁶ sejt). A kimutatott 2-hidroxioglutarát onkometabolit-termelés háttérében Sanger szekvenálással, a Molekuláris Onkohematológia Labor segítségével igazoltuk a heterozigóta IDH1 R132H *missense*, funkciónyeréses mutációt.



17. ábra. Károsodott morfológiájú mitokondriumok a HT-1080 fibrosarcoma sejten a normál sejtek és a ZR-75.1 emlőcarcinoma normál morfológiájú mitokondriumi (nyilak) mellett. Az elektronmikroszkópos felvételeket Dr. Paku Sándor készítette.

Vizgáltuk a 2-hidroxi-glutarát onkometabolit bioenergetikai forrását is. Egy-egy ^{13}C -jelölt szubsztrát ($\text{U-}^{13}\text{C}$ -glükóz, $2\text{-}^{13}\text{C}$ -acetát, $\text{U-}^{13}\text{C}$ -glutamin) jelenlétében DMEM D5030 médiumban inkubáltuk a sejteket. Az LC-MS méréssel meghatároztuk 2-hidroxi-glutarátban megjelenő ^{13}C szénatomokkal jelölt onkometabolitok %-os arányát. Egy órás jelölés/inkubálás után HT-1080 sejtekben $2\text{-}^{13}\text{C}$ -acetátból származó beépülést nem figyeltünk meg, míg glükózból a teljes 2-HG pool közel 6%-a vált jelöltté és nemcsak egy, hanem két jelölt szénatomos 2-HG molekulákat is kimutattunk (M+1 és M+2). $\text{U-}^{13}\text{C}$ -glutamin jelölés után a teljes 2-HG pool 16%-a volt jelölt (M+5). Ezek alapján a 2-HG fő forrása a HT-1080 sejtekben a glutamin (az általunk vizsgált szubsztrátok közül) (**18. ábra**).

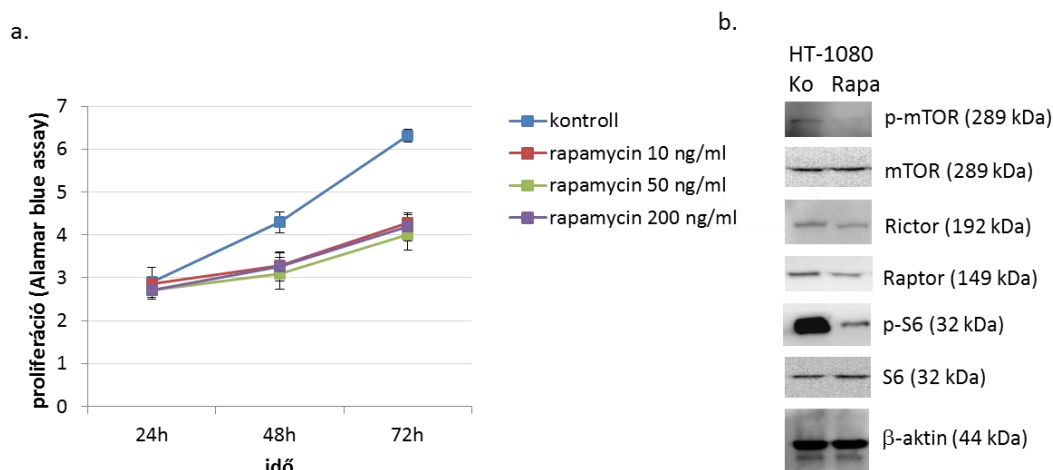


18. ábra. A 2-HG onkometabolit lehetséges bioenergetikai forrásai HT-1080 fibrosarcoma sejtekben LC-MS mérések alapján. U-¹³C-glükóz (a.) ill. U-¹³C-glutamin (b.) beépülései a teljes 2-HG „pool” százalékában megadva, 60 perces jelölés után. M+1/2/3/5: 1/2/3, ill. 5 ¹³C jelölést tartalmazó 2-HG molekula.

4.2.2. Rapamycin mTOR aktivitás gátló hatásai (proliferációs és fehérje szintű vizsgálatok) HT-1080 sejtekben

A továbbiakban tanulmányoztuk a hyperglükolitikus fenotípus, károsodott mitokondriális működés, 2-HG onkometabolit-termelés és magas mTORC1 aktivitás közötti összefüggést a HT-1080 sejtekben. 10-50-200 ng/ml rapamycin kezelés proliferáció gátló hatásait is teszteltük, végül 50 ng/ml dózist választottuk ki a további kísérletekhez. Alamar blue teszt és sejtszámolós vizsgálatunk is igazolták a rapamycin időfüggő proliferáció gátló hatását HT-1080 sejtekben (**19. a. ábra**). 24-72 órás rapamycin kezelés után a HT-1080 sejtekben áramlási citometriával szignifikáns apoptotikus változásokat azonban nem tapasztaltunk, a spontán apoptózis mértéke a kezelt sejtekben nem emelkedett.

A rapamycin kezelés után a p-S6 és a p-mTOR mennyiségének csökkenését Western blottal igazoltuk, a két fehérje mennyiségében ~85%-os csökkenést mutattunk ki (denzitometrált eredmények) változatlan S6 és mTOR expresszió mellett. A rapamycin kezelés hatásaként az mTORC1 komplex karakterisztikus vázfehérjéjének (Raptor) expresszió csökkenését is tapasztaltuk (**19. b. ábra**).

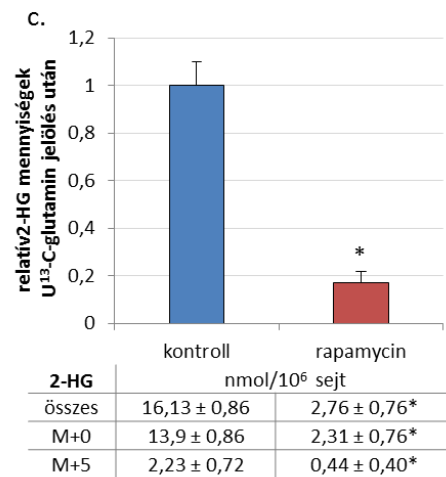
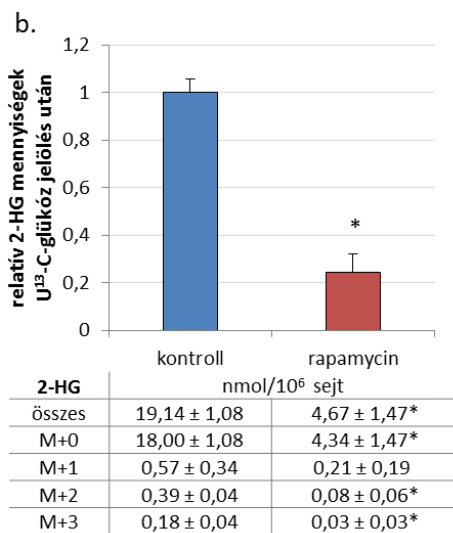
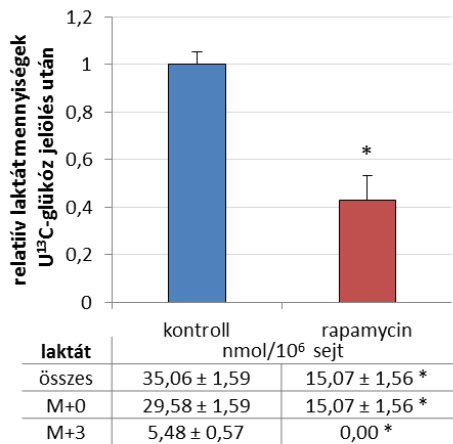


19. ábra. Az mTORC1 gátló rapamycin hatásai a proliferációra és az mTOR komplexek aktivitásával kapcsolatos fehérjékre *in vitro* HT-1080 sejtekben (Western blot). A rapamycin időfüggő (0-72 h) és dóziszfüggő (10-200 ng/ml) hatásai Alamar blue proliferációs teszttel (a.). 48 órás rapamycin (50 ng/ml) kezelésre csökkentette az mTOR kináz, Raptor, pS6 expressziót (b.). Ko=kontroll, Rapa=rapamycin.

4.2.3. Rapamycin kezelés, az mTORC1 aktivitás laktát és 2-HG onkometabolit-termelést befolyásoló hatása

LC-MS méréseink eredményei szerint a 72 órás *in vitro* rapamycin kezelés szignifikánsan csökkentette az intracelluláris laktát és a 2-HG mennyiségét a HT-1080 sejtekben. Megfigyeltük továbbá más citrátköri intermedierek (citrát, malát, szukcinát) mennyiségének nem szignifikáns változásait is. 48 óra rapamycin kezelés után a sejteket 1 óráig DMEM D5030 médiumhoz adott U-¹³C-glükózzal vagy U-¹³C-glutaminnal is jelöltük és vizsgáltuk a 2-HG, illetve a laktát mennyiségét, valamint a beépülő ¹³C szénatomok megjelenését az onkometabolitokban (a ¹³C-jelölést nem tartalmazó (jelöletlen) és a ¹³C-jelölt metabolitok mennyiségét is meghatároztuk). U-¹³C-glükóz jelölést követően a jelöletlen laktát mennyisége közel 50%-ra csökkent, jelölt laktátot pedig nem tudtunk kimutatni a rapamycin kezelt sejtekben. Megfigyeltük, hogy a rapamycin kezelt U-¹³C-glükóz jelölt sejtekben a jelöletlen és jelölt 2-HG (M+1, M+2) mennyisége is csökkent. U-¹³C-glutamin jelölést követően azonban az előbbinél szignifikánsan jelentősebb változást figyeltünk meg a jelöletlen (75%-kal csökkent) és a

jelölt (M+5) 2-HG mennyiségében a rapamycin kezelt HT-1080 sejtekben. U-¹³C-glutamin vizsgálati körülményeink mellett a laktátot nem jelölte (**20. ábra**).

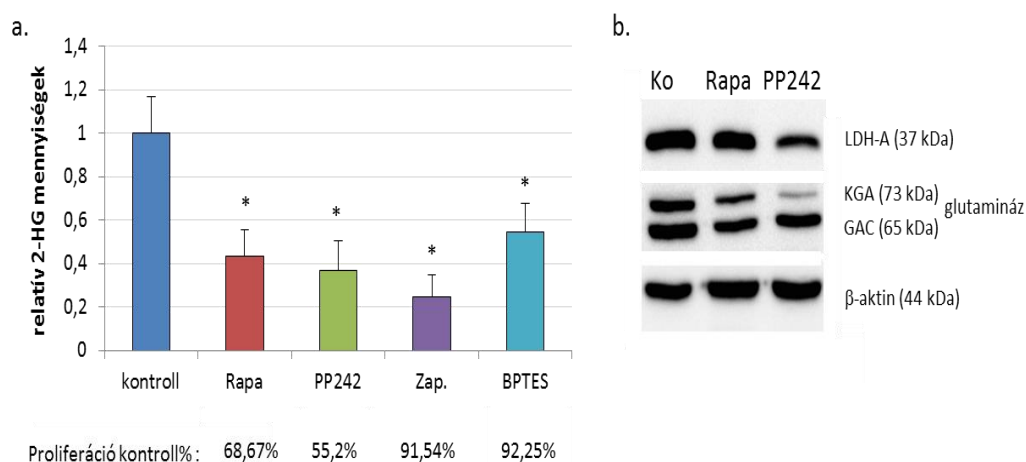


20. ábra. 48 óra rapamycin kezelés csökkenti a glükózból képződő tejsav (a), 2-HG (b), illetve a glutaminból keletkező 2-HG (c) mennyiségét HT-1080 sejtekben (¹³C-szubsztrát jelöléses vizsgálatokban). A grafikonokon az összes metabolit mennyisége (jelölt + jelöletlen) a kontrollhoz (kezeletlen) viszonyított relatív értékekkel szerepel. A grafikonok alatt a táblázatokban a részletes adatok találhatóak nM/1 millió sejt értékekben megadva. A metabolitok mennyiségét LC-MS módszerrel határoztuk meg. p<0,05 * szignifikáns változások.

4.2.4. mTORC1 aktivitás 2-HG és laktát onkometabolit-termelést csökkentő hatásának háttere

Ismert az mTORC1 komplex szabályozó szerepe a glikolízis és a glutaminolízis folyamatában. A rapamycin kezelés LDH-A (sejtek laktát termelésében kulcsfontosságú) és glutamináz (glutamin hasznosításban fontos enzim) enzim expressziót gátló hatásait áramlási citometriával és Western blotlalt igazoltuk 48 h rapamycin kezelés után. A glutamináz aktivitás gátló BPTES és Zaprinst a rapamycinhez hasonlóan szignifikánsan csökkenti a 2-HG szintet HT-1080 sejtekben [143]. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a BPTES és Zaprinst szignifikánsan csökkentette a HT-1080 sejtek proliferációját is (**21. a. ábra**). A rapamycin az előbbiekhöz képest azonban szignifikánsan nagyobb mértékű proliferáció gátló hatást mutatott *in vitro*, mint a glutamináz gátlók; a rapamycin és a Zaprinst együttes alkalmazásakor pedig nem figyeltünk meg additív hatást a proliferáció gátlásban.

Más mTOR inhibitor vegyületek hasonló hatását is vizsgáltuk, a PP242 mTORC1 és mTORC2 inhibitor HT-1080 sejtek a proliferációját ~40%-kal csökkentette, szignifikánsan nagyobb mértékben, mint a rapamycin. Kísérleteinkben a 2-HG és a laktát mennyiségében is ki tudtuk mutatni az mTOR, mTORC1 gátlással összefüggő, hasonló mértékű onkometabolit-termelést gátló hatásait. Ezek az eredmények megerősítik a rapamycin laktát és 2-HG termelést csökkentő hatásait, az mTOR transzlációs, glutamináz és LDH-A-expresszió szabályozásán keresztüli 2-HG és laktát termelést érintő metabolikus hatásait (**21. b. ábra**).



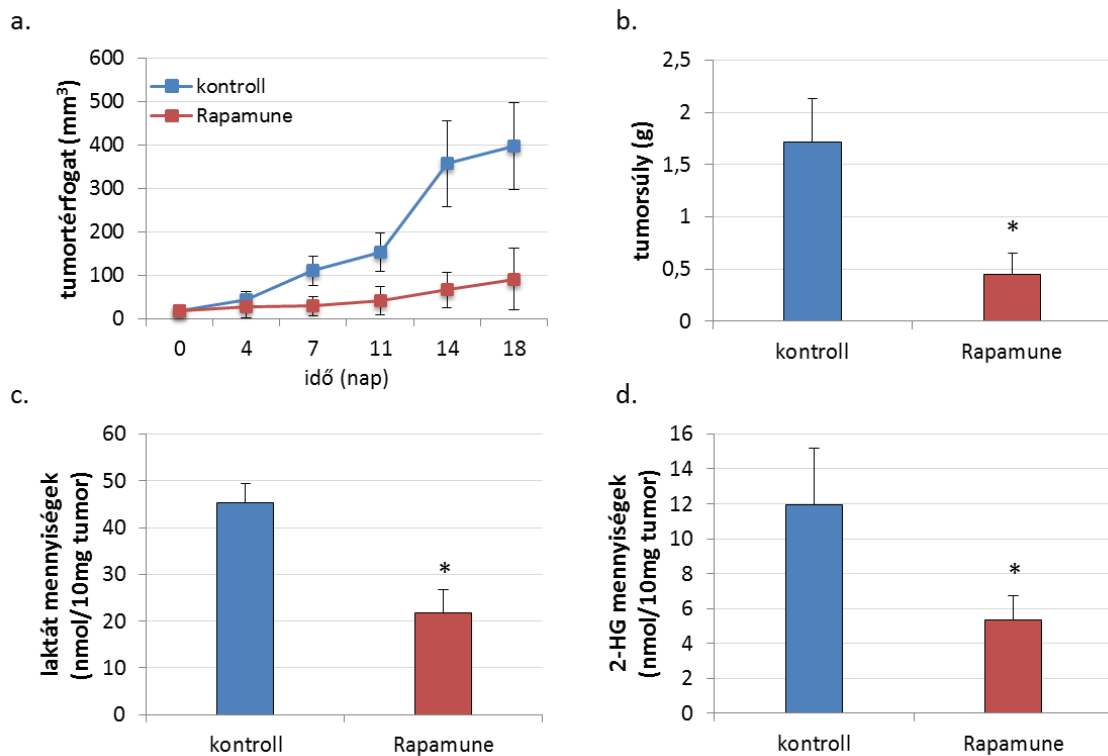
21. ábra. Az mTOR gátlók (mTORC1 – rapamycin, mTORC1 és C2 – PP242) laktát-dehidrogenáz-A és glutamináz expressziót, illetve mTOR gátlók és glutamináz gátlók (Zaprinast és BPTES) 2-HG termelést, valamint sejtproliferációt befolyásoló hatásai HT-1080 sejtekben. A kezelések a proliferáció gátló hatás (Alamar blue assay) mellett a 2-HG termelést (kontrollhoz viszonyított relatív értékek – LC-MS mérés) is gátolják, hasonlóan a glutamináz gátlókhöz (Zaprinast – 100 μ M; BPTES – 10 μ M) (a.). 48 órás rapamycin (50 ng/ml), ill. PP242 (1 μ M) kezelés csökkenti az LDH-A és glutamináz expressziót (Western blot) (b.).

A rapamycin laktát és 2-HG termelést csökkentő hatását más, sejtvonalakban is teszteltük. ZR-75.1 sejteket, és két Hodgkin-lymphoma sejtvonalat (DEV, KMH2) is vizsgáltunk. A ZR-75.1 sejtekben a rapamycin kezelés hatására az intracelluláris laktát koncentráció 65%-ra csökkent, míg a DEV és a KMH2 sejtek esetében kisebb mértékű csökkenést figyeltünk (DEV 75%-ra, KMH2 85%-ra). 2-HG onkometabolitot termelő sejtvonal a HT-1080-on kívül a vizsgálat ezen szakaszában nem állt rendelkezésünkre. Endogén IDH mutációval rendelkező glioma sejtvonalat nem is sikerült beszerezni. Ilyen sejtvonalak nem léteznek, stabilizálni nem sikerült mutáns sejtvonalakat, csak rövid ideig vagy xenograftban lehet ezeket fenntartani. Későbbiek során Dr. William Leenders (Radboud University, Hollandia) rendelkezésünkre bocsátotta genetikailag módosított U251 MG astrocytoma sejtvonalát. Egy vad és IDH1 mutáns (IDH1 R132H fehérjét overexpresszáló) U251 MG sejtvonal párt – mutáns sejtvonalban a mutáns

fehérjét immunhisztokémiai festéssel igazoltuk és LC-MS méréseinkben is nagymennyiségű 2-HG-ot mutattunk ki ezekben a sejtekben. Ebben a mutáns sejtvonalban is igazoltuk a rapamycin mTORC1 aktivitást (p-S6 expresszió csökkenés), enyhe proliferáció gátló (20%-os gátló hatás), és 2-HG termelést csökkentő hatását (kontroll 75%-a). Az U251 MG IDH1 vad, illetve mutáns sejtvonal párban a glutamináz expresszió ebben a két sejtvonalban is szignifikánsan csökkent rapamycin kezelést követően 48 órával, a proliferációhoz hasonlóan.

4.2.5. Rapamycin *in vivo* hatásai HT-1080 xenograft modellben (tumornövekedés, szöveti laktát és 2-HG mennyiségek vizsgálata)

HT-1080 tumorsejteket SCID egerek talpába oltottuk. A tapintható tumorok megjelenése után az állatokat Rapamune-nal kezeltük. A kísérletben a rapamycin a tumornövekedését csökkentette *in vivo* is, a kísérlet végén a kezelt tumorok tömege szignifikánsan alacsonyabb volt a kontrollhoz képest. Folyékony nitrogénben fagyasztott szövetmintákban a Rapamune kezelt szövetekben a laktát és a 2-HG mennyiségének csökkenését igazoltuk LC-MS méréseink segítségével. *In vivo* eredményeink az *in vitro*-hoz hasonlóan igazolták a rapamycin tumornövekedést gátló, laktát és 2-HG termelés csökkentő hatásait (**22. ábra**).



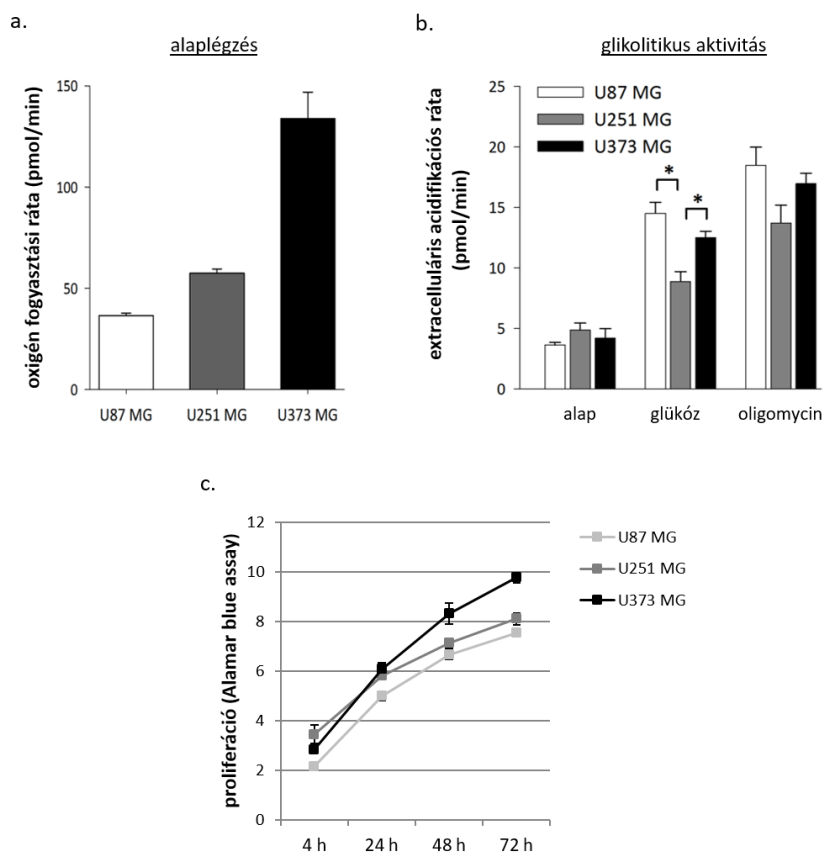
22. ábra. Rapamycin (Rapamune) *in vivo* tumornövekedést (a-b), laktát (c), illetve 2-HG (d) termelést gátló hatása SCID egerekbe oltott HT-1080 xenograftokban 3 héttel a kezelés (3mg/ttkg - 3 x hetente) után. A kontroll és a rapamycin kezelt állatok tumorainak növekedését követtük a mért tumortérfogat változások alapján (a.), illetve a kísérlet végén mért tumorok tömegének átlagát (b.), valamint a tumorszövetben mért laktát (c.) és 2-HG (d.) nmol/10 mg tumorszövetre számított mennyiségét ábrázoltuk. *: $p < 0,05$

4.3. Glioma sejtvonalak bioenergetikai tulajdonságainak vizsgálata az IDH1 vad és mutáns sejtvonalak összehasonlítása

4.3.1. Glioma sejtvonalak alaplégzésében, glikolitikus aktivitásában kimutatható különbségek

A vizsgálatainkban humán gliomás tumorszövetből stabilizált, sejtbankokban elérhető három glioma sejtvonal (U251 MG, U87 MG és U373 MG) alaplégzésének Seahorse vizsgálatában szignifikáns különbségeket mutattunk ki. A legalacsonyabb alap oxigénfogyasztást az U87 MG sejtekben, míg a legmagasabbat az U373 MG sejtekben figyeltünk meg (DMEM D5030 tápanyag hiányos médiumban), az előbbi különbségek

ellenére azonban a bazális extracelluláris savasodásban (ECAR) – alap tejsavtermelő glikolítikus aktivitásban – a vizsgált sejtek szignifikánsan nem tértek el. A sejtek metabolikus és metabolikus adaptációs különbségeire utalnak azonban azok az eredményeink, amelyekben a magasabb glükóz hasznosítási képesség, ill. mitokondriális gátlást követően a glükóz hasznosítás a legalacsonyabb alaplégzésű sejtekben (U87 MG) az alap oxigénfogyasztással mutatott fordított összefüggést. A sejtek egyedi bioenergetikai jellemzői glutamin oxidációs különbségeikben is kimutathatók voltak: az U251 MG sejtek rendelkeztek a legjelentősebb glutamin oxidációs képességgel. A sejtek bioenergetikai különbségei pedig a sejtek *in vitro* proliferációs jellemzőivel (DMEM high glucose + 10% FBS médiumban) összefüggést mutattak – a legnagyobb proliferációs aktivitása a glükózt jól hasznosítani képes, és ezzel párhuzamosan magas alap oxidációs kapacitással rendelkező U373 MG sejteknek volt (**23. ábra**).

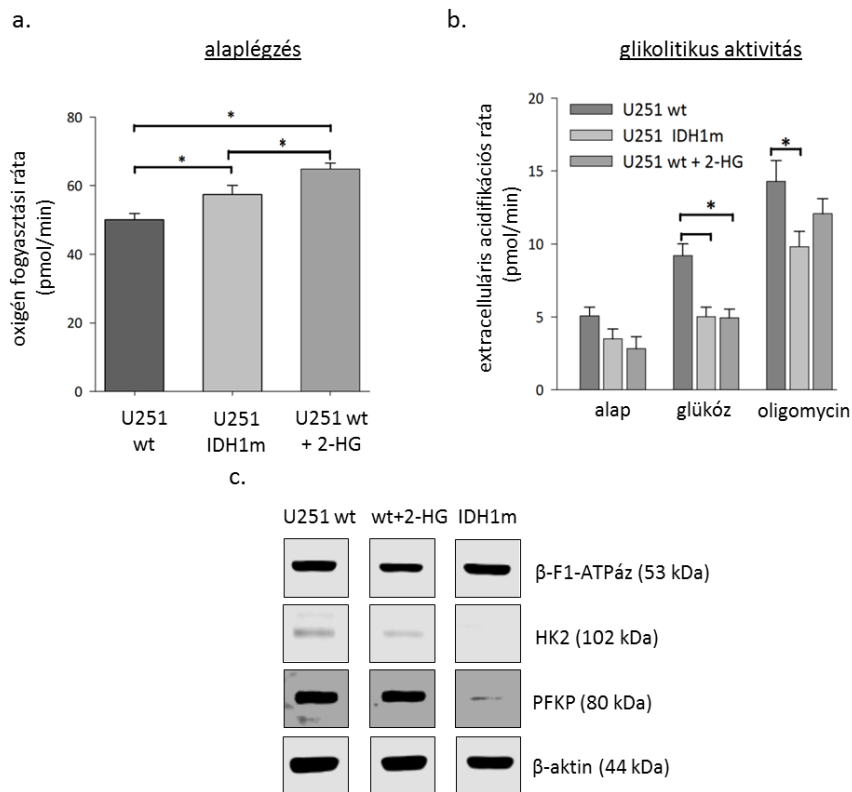


23. ábra. Alaplégzés (a.), extracelluláris savasodás (ECAR) (b.) vizsgálata Seahorse méréssel, ill. proliferációs görbék (c.) U251 MG, U87 MG és U373 MG glioma sejtvonalakon. A sejtek alaplégzését és ECAR értékét DMEM D5030 médiumban mértük (a.); az ECAR méréseknél 10 mM glükóz, illetve ezt követően 2 μ M oligomycin hozzáadása után is meghatároztuk a médium pH változását, ami a glikolízis, a tejsav keletkezés és az extracelluláris megjelenés mértékét mutatja (b.). A sejtvonalak proliferációs jellemzőit normál tenyésztési körülmények mellett teljes médiumban hasonlítottuk össze, Alamar blue assay segítségével (c.). *: $p < 0,05$

4.3.2. Az IDH1 mutáns sejtekben, a 2-HG termeléssel párhuzamosan a sejtek alaplégzése magasabb, míg a glikolitikus kapacitása csökken

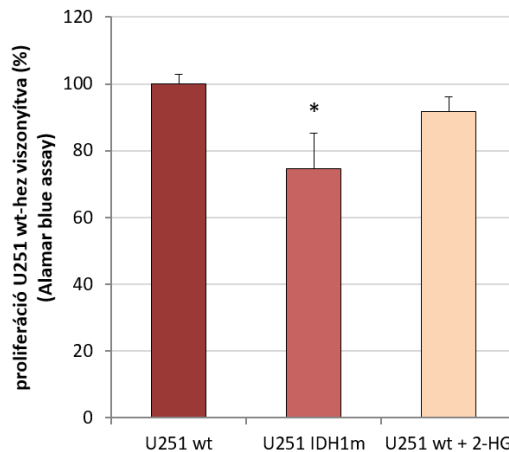
Vizsgáltuk a gliomákban leggyakrabban előforduló IDH1 mutáció – R132H – alapanyagcserét és szubsztrát hasznosítást befolyásoló hatásait is. Rendelkezésünkre állt az U251 MG IDH1 vad típusú (U251 wt a továbbiakban) és annak IDH1 R132H mutáns fehérjét overexpresszáló párja (U251 IDH1m a továbbiakban). Ezekkel, illetve a 72 órán át D-2-HG-tal kezelt U251 wt sejtekkel (4 mM D-2-HG előkezelés) összehasonlító

vizsgálatokat végeztünk. Az IDH1m és a 2-HG kezelt vad típusú U251 sejtek is szignifikánsan emelkedett oxigénfogyasztást mutattak az U251 wt sejtekhez képest. Ezzel párhuzamosan szignifikánsan csökkent az alap glikolítikus aktivitás és a sejtek glükóz hasznosító képessége, glikolítikus kapacitása is; még mitokondriális gátlók használata mellett sem emelkedett a glikolízis mértéke a vizsgált mutáns és 2-HG kezelt sejtekben annyira, mint az U251 wt sejtek esetében. Megállapítottuk, hogy az IDH mutáció, ill. a 2-HG kezelés befolyásolja az anyagcsere folyamatokat jellemző metabolikus enzimek expressziós szintjét (Western blot). Az alacsonyabb alaplégzéssel összefüggésben a vártak megfelelő alacsonyabb β -F1-ATPáz expressziót igazoltunk az U251 wt sejtekben. A glikolízisben kulcsfontosságú enzimek közül a pedig a HK2 és a PFKP mutatott csökkent expressziót az IDH1 mutáns sejtekben a vad típusú sejtekhez képest (**24. ábra**).



24. ábra. Alaplégzés (a.) és extracelluláris acidifikáció (ECAR) (b.) vizsgálata Seahorse méréssel, illetve az ezekkel összefüggő fehérjék expressziója (c.) U251 wt, U251 IDH1m U251 wt 2-HG kezelt glioma sejtvonalakon. Az alap metabolikus különbségekkel összefüggést mutatott a glikolízis enzimek (hexokináz 2 – HK2 – és foszfofruktokináz-P – PFKP) és az oxidatív foszforilációban fontos β -F1-ATPáz expressziója (Western blot). $p^* < 0,05$.

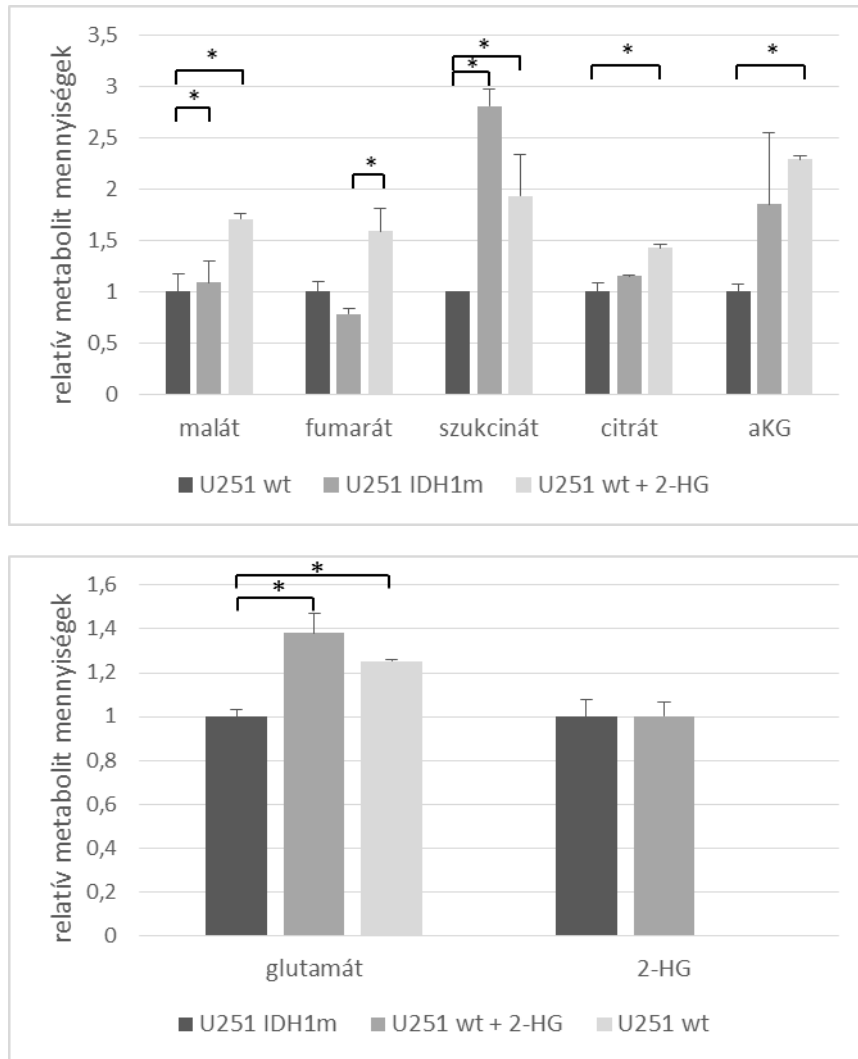
Az U251 wt és IDH1m sejtek proliferációját összehasonlítva a mutáns sejtek lassabban proliferálnak, mint a nem mutánsak – a duplázódási idejük egy órával hosszabbnak bizonyult, sejtszámolással és Alamar blue teszttel készített proliferációs görbék esetében is. A 72 órás D-2-HG (4 mM) kezelés szignifikánsan nem változtatta meg az U251 wt sejtek proliferációjának ütemét (**25. ábra**).



25. ábra. Az U251 wt, U251 IDH1m és U251 2-HG kezelt glioma sejtvonalak proliferációjának vizsgálata. Teljes médiumban (DMEM high glucose, 10% FBS) azonos sejtszámmal (2500 sejt/100 μ l) párhuzamos vizsgálatban meghatározott proliferáció mértéke az U251 wt sejtek proliferációjának (100%) százalékában 2-HG (D-2-HG - 4 mM) kezelt, illetve U251 IDH1m sejtvonalakban. * $p < 0,05$

4.3.3. Intracelluláris metabolit koncentrációk és a 2-hidroxioglutarát forrásának vizsgálata IDH1 wt illetve mutáns gliomasejtekben

A metabolikus különbségeket a két sejtvonal (az U251 wt és U251 IDH1m), illetve a 2-HG kezelt vad típusú sejtek között a sejtek intracelluláris metabolit tartalma is mutatta. LC-MS mérésekkel igazoltuk az IDH1 mutáns sejtekben felhalmozódó 2-HG jelenlétét, illetve bizonyítottuk, hogy a médiumhoz adott 2-HG a vad típusú sejtekben a mutáns kezeletlen sejtekhez hasonló intracelluláris koncentráció értékkel jelent meg. Előbbiek mellett az aKG szint és a TCA metabolitok szintjének emelkedését is igazoltuk mind az IDH1 mutáns, mind a 2-HG kezelt sejtekben is. Előbbiek mellett az IDH1 mutáns sejtekben a vad típusú sejtekhez képest szignifikánsan alacsonyabb glutamát szintet tapasztaltunk. A 2-HG kezelés hatására pedig a vad típusú sejtekben emelkedett a glutamát mennyisége (**26. ábra**).

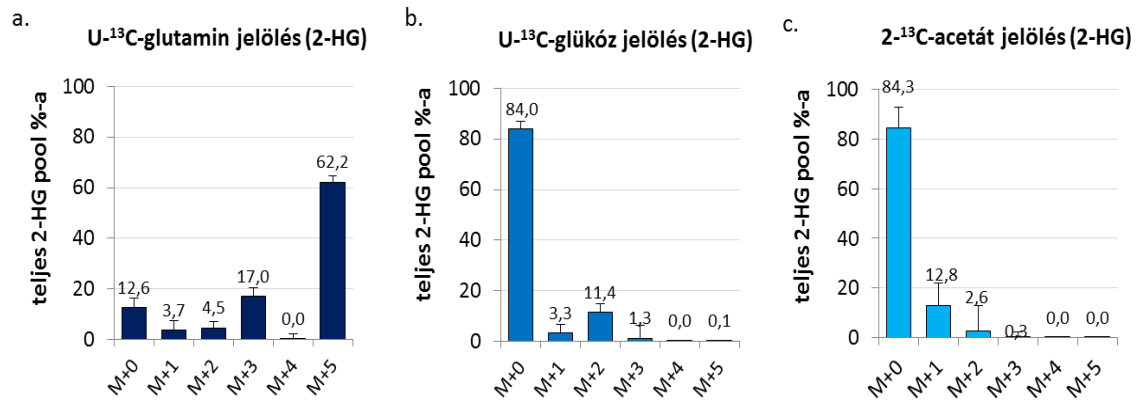


26. ábra. Az U251 wt, U251 IDH1m és U251 2-HG kezelt (4 mM, 72 h) glioma sejtvonalak intracelluláris metabolit mennyiségeinek meghatározása LC-MS módszerrel. aKG: α -ketoglutarát. n.d: nem detektált. * $p < 0,05$

Az IDH1 mutáns sejtekben ^{13}C -jelölt szubsztátokkal ($\text{U-}^{13}\text{C}$ -glutamin, $\text{U-}^{13}\text{C}$ -glükóz és $2\text{-}^{13}\text{C}$ -acetát) vizsgáltuk a 2-HG forrását. Igazoltuk, hogy a glutamin, az acetát bioszintetikus hasznosításához szükséges transzporterek, enzimek (ASCT2 – glutamin transzporter, GLS – glutamináz, ACS2 – acetyl-CoA szintetáz 2) az U251 sejtben jelen vannak.

Rövid távú (1 óras) jelölést követő LC-MS vizsgálataink eredményei azt mutatják, hogy a 2-HG forrása lehet a glükóz és a glutamin, az acetát azonban nem. Hosszú távú jelölés (24 óra) után egyértelműen igazoltuk, hogy a keletkező 2-HG fő forrása a glutamin (a teljes 2-HG pool 88%-a jelölődött $\text{U-}^{13}\text{C}$ -glutamin szubsztát adása után) és

ez jól korrelál a mutáns sejtekben megemelkedő glutamináz és glutamin transzporter (ASCT2) mennyiségével. Azt tapasztaltuk, hogy 24 órás U-¹³C-glutamin jelölést követően M+5 tömegszámú jelölés mutatható ki az intracelluláris 2-HG 62%-ában, míg M+3 tömegszámú jelölés további 17%-ban. Ez arra utal, hogy a 2-HG elsősorban glutamát-aKG-2-HG útvonalon közvetlenül képződik. Az M+3 jelölés jelentős százalékos aránya viszont azt mutatja, hogy a citrát-ciklusban aKG-n keresztül is képződhet 2-HG. 24 órás vizsgálatainkban azonban azt is kimutattuk, hogy a 2-HG származhat glükózból és acetátból is csak jóval kisebb mértékben. U-¹³C-glükóz jelölés után teljes 2-HG pool 15,95%-a, míg 2-¹³C-acetát jelölés után teljes 2-HG pool 15,7%-a tartalmazott jelölést (27. ábra).

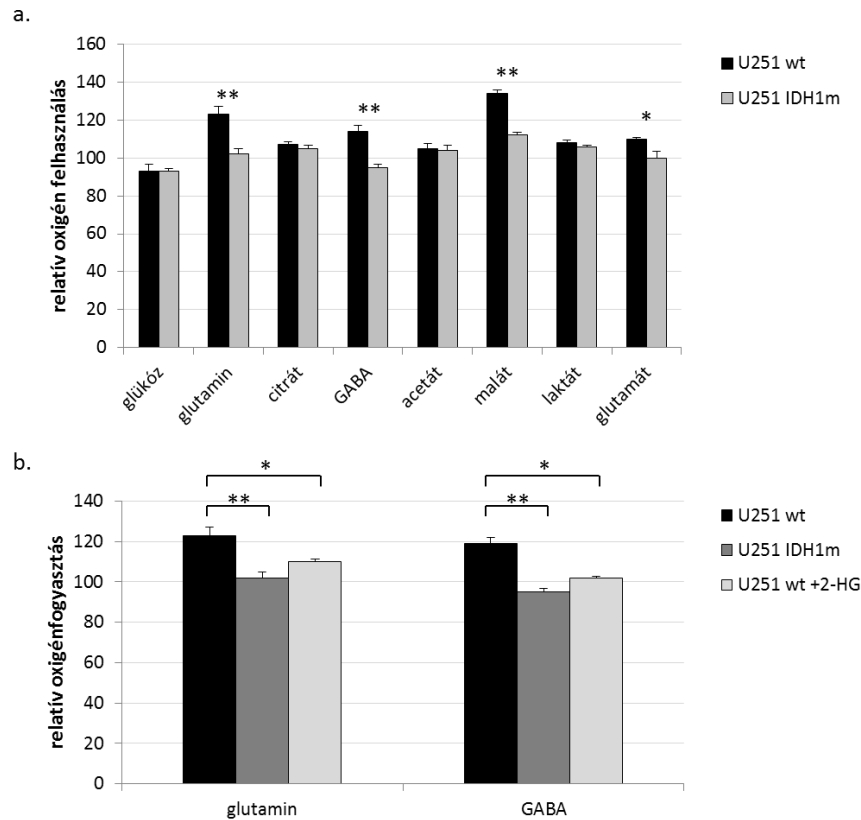


27. ábra. A 2-HG bioenergetikai forrásainak vizsgálata U-¹³C-glutamin (a), U-¹³C-glükóz (b), és 2-¹³C-acetát (c) szubsztrát ¹³C beépülésének LC-MS mérésével 24 h után U251 IDH1m sejtekben. A jelölésekben használt szubsztrátok: 10 mM U-¹³C-glükóz; 4 mM L-glutamin + 4 mM U-¹³C-glutamin; ill. 10 mM 2-¹³C-acetát 10% FBS mellett. M+0: jelöletlen 2-HG, M+1/2/3/5: 1/2/3/4 vagy 5 ¹³C jelölést tartalmazó 2-HG molekula.

4.3.4. Az IDH1 mutáció, az intracelluláris 2-HG és a bioenergetikai szubsztrátok oxidációjában kimutatható különbségek összefüggései U251 glioma sejtekben

Az IDH mutáns és vad sejtek bioenergetikai szubsztrát oxidációs különbségeit, oxigénfogyasztási különbségeiket Seahorse méréssel határoztuk meg. A glükóz oxidációban nem tapasztaltunk különbséget, és hasonló oxigénfogyasztást figyeltünk meg a citrát, az acetát és a laktát esetében is. Az IDH1 mutáns sejtekben azonban a glutamin, a glutamát, ill. a malát szignifikánsan alacsonyabb oxidációját tapasztaltuk. Előbbiek mellett, GABA hozzáadása szignifikánsan, közel 20%-kal emelte az U251 wt sejtek oxigénfogyasztását, míg U251 IDH1m sejtekben ez az emelkedés nem jelent meg. Azt is kimutattuk, hogy a vad típusú sejtek GABA oxidációs képességét a 2-HG kezelés szignifikánsan csökkenti (**28. ábra**).

A Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org>) adatbázis alapján az U251 MG sejtvonal nem rendelkezik GABA receptor, illetve a különböző GABA receptor alegységek (GABRA 1-6, GABRB 1-3, GABRR 1-3, GABRE és GABRQ) mRNS expressziójával. Az U251 wt sejtekben kimutatott oxigénfogyasztás emelkedés ezek alapján független a GABA receptor mediált folyamatoktól.

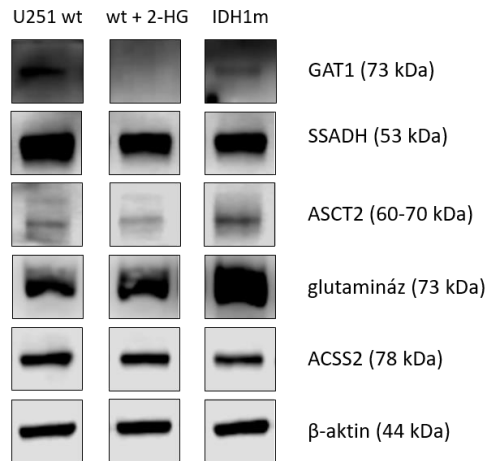


28. ábra. Különböző szubsztrátok oxidációja U251 wt és U251 IDH1m (a.), illetve 2-HG kezelt U251 wt (b.) glioma sejtekben Seahorse módszerrel mérve 72 h után. Glükóz (10 mM), glutamin (2,5 mM), citrát (5 mM), GABA (5 mM), acetát (10 mM), malát (10 mM), laktát (5 mM), glutamát (5 mM) szubsztrátok (a), ill. glutamin és GABA hatására (b). Oxigénfogyasztás az alaplégzés %-ában van feltüntetve. * $p < 0,05$.

A glutamin bioenergetikai hasznosítása, oxidációja csak az U251 wt sejtvonalat jellemezte, a mutáns sejtekben ez nem volt megfigyelhető; a 2-HG kezelt sejtekben pedig szignifikánsan alacsonyabb volt a kezeletlen sejtekhez képest.

A GABA bioenergetikai hasznosításában, oxidációjában fontos szerepet játszó enzim a szukcinát szemialdehid-dehidrogenáz (SSADH) magas expresszióját igazoltuk az U251 glioma sejtekben, ami alátámasztható a Human Protein Atlas mRNA adatbázisának adataival, amely szerint az U251 sejtvonatra magas SSADH mRNS expresszió jellemző. Western blot vizsgálatainkban az IDH1 mutáns U251 és a 72 óráig 2-HG-tal kezelt U251 sejtekben az SSADH expresszió alacsonyabb, mint a vad típusú

kezeletlenekben. Jelentősebb különbségeket a GABA transzporter (GAT1) expresszióban is megfigyeltünk a kezeletlen wt, a 2-HG kezelt és az U251 IDH1m sejtekben. Más általunk vizsgált glioma sejtvonalakban, mint az U373 MG és U87 MG sem SSADH expresszió, sem GABA oxidáció nem volt detektálható (**29. ábra**).



29. ábra. Az energiaszubsztrátok oxidációjával, hasznosításával összefüggő transzporterek és enzimek expressziója U251 wt, U251 IDH1m és U251 wt 2-HG kezelt glioma sejtvonalakban. A GABA anyagcserében résztvevő GABA transzporter 1 (GAT1) és szukcinát szemialdehid-dehidrogenáz (SSADH); a glutamin hasznosításában résztvevő glutamin transzporter (ASCT2) és glutamináz; valamint acetát hasznosításában szerepet játszó acetyl-CoA szintetáz 2 (ACSS2) expressziójának vizsgálata Western blottal.

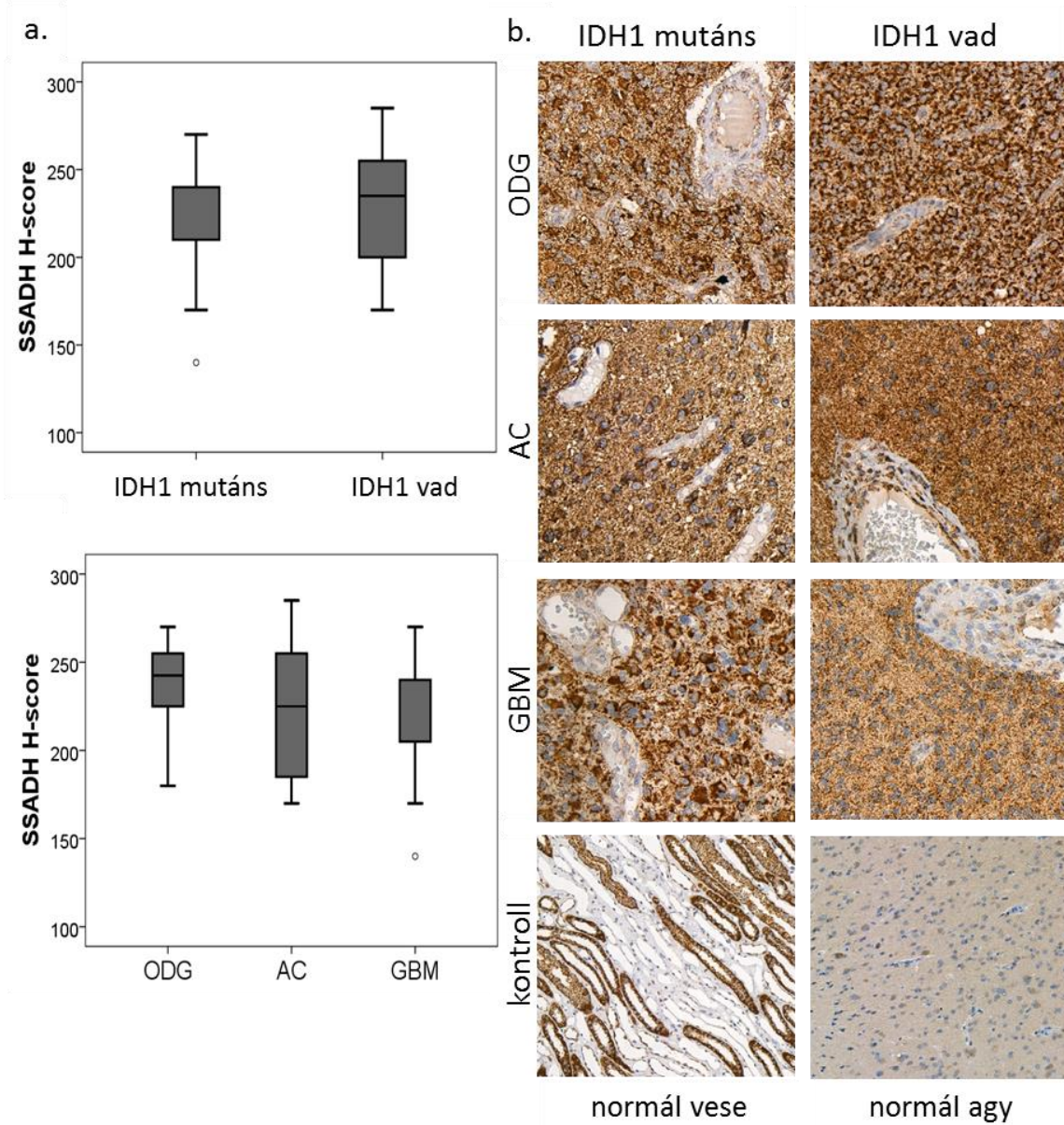
4.3.5. Rövid és hosszú távú GABA kezelés proliferációs hatása vad és IDH1 mutáns U251 sejtekben

A GABA proliferációt befolyásoló hatásait rövid távú (72 óra) és hosszú távú (3,5 hét) kísérletekben U251 wt és IDH1m sejtekben vizsgáltuk. GABA, 2-HG, és GABA+2-HG hosszú távú kezeléseket után kimutattuk, hogy a GABA hozzáadása szignifikánsan fokozta az U251 wt sejtek proliferációját, de ez a hatása a GABA kezelésnek a 2-HG kombinált kezelés esetében alig jelentkezett, csökkent az U251 wt sejtekben. Az IDH1m sejtek proliferációját a GABA kezelés kis mértékben ugyan fokozta, de kevésbé, mint a vad típusú sejtekét.

4.4. SSADH expresszió vizsgálata humán biopsziás glioma mintákon

SSADH expressziót humán glioma biopsziás mintákon is vizsgáltuk immunhisztokémiai módszerrel. Kontrollként peritumorális normál agyszövetet (cerebrum és cerebellum) és veseszövetet is használtunk az. A peritumorális cerebrum magas SSADH expresszióját (H-score > 150) figyeltük meg a kortikális régióban, viszont az astrocyta sejtek alacsony vagy közepes mértékben (H-score <150) expresszálták az SSADH fehérjét. A kisagyi szövetben közepes-magas SSADH expressziót tapasztaltunk a Purkinje-sejtekben.

A humán glioma minták (47 glioma humán biopsziás mintát vizsgáltunk) 97%-a magas SSADH expressziót mutatott, mely a vizsgált klinikopatológiai paraméterekkel (kor, nem, tumor típusa, grádusa vagy IDH1 mutációs státusz) kimutatható szignifikáns összefüggést nem mutatott a szinte minden esetben jellemző fokozott expresszió miatt **(30. ábra)**.



30. ábra. A szukcinát szemialdehyd-dehidrogenáz (SSADH) expresszió vizsgálata immunhisztokémiai festéssel humán glioma biopsziákban. Az SSADH a tumorok 97%-ában magas expressziót mutatott, ez a fokozott expresszió a tumorok típusával és az IDH1 mutációs státuszával nem mutatott összefüggést (a.). A glioma altípusok reprezentatív immunhisztokémiai festése (b.) AC: astrocytoma, OD: oligodendroglioma, GBM: primer glioblastoma. Nagyítás: 200x

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Bioenergetikai folyamatok vizsgálatára alkalmas *in vitro* módszerek

Vizsgálataink igazolták feltevésünket, miszerint a glükózból és az acetátból felszabaduló CO₂ mennyiségének összehasonlítása ígéretes módszer a tumorsejtek, valamint a tumorok gazdaszervezetre gyakorolt bioenergetikai mechanizmusának tanulmányozásában. A glükóz és az acetát a glikolízis, illetve a mitokondriális oxidatív foszforiláció jellegzetes energiaforrása. A két energiaforrás hasznosításának párhuzamos összehasonlító vizsgálata segítségével az *in vitro* sejtvonalak domináns energetikai mechanizmusa – glikolízis és oxidatív foszforiláció aránya – megközelíthető.

A daganatok fokozott glükóz felvételének vizsgálata napjainkban része a képalkotó diagnosztikai eljárásoknak (PET-CT alkalmazás). Warburg közel egy évszázada írta le a tumorsejtek fokozott glükóz felvételét, fokozott tejsavtermeléssel kapcsolatos megállapításait [12, 13]. Több évtizedes tudományos vitát követően igazolódott elmélete, megállapították, hogy a daganatok többségében valóban emelkedik a tejsavtermelés [18]. Párhuzamosan a mitokondriális enzimek génmutációinak tumorbiológiai szerepe is jellemzésre került, egyre több onkogének (pl. Ras, MYC, AKT) közreműködését ismerjük meg a glükóz anyagcsere átprogramozásában, szabályozásában [7]. A tumorok metabolikus változásainak vizsgálata, a humán tumorok metabolikus jellemzése azonban rutinszerűen alkalmazható vizsgálati módszerek és eljárások hiányában még csak az elmúlt években kezdődött.

A tumorsejtek megváltozott anyagcseréje a malignus fenotípus jellemzője, ezért egyre több vizsgálat célja a tumorsejtek bioenergetikai profiljának jellemezésére alkalmas módszerek beállítása, fejlesztése [20, 144, 145].

Egyre szélesebb körben elterjedő módszer a stabil vagy radioaktív szénizotóp-jelölt szubsztrátok felhasználása, a beépülő jelzett szén atomok útjának követése a tumorsejtek preferált bioenergetikai útvonalainak feltérképezésében [138, 145, 146], bár a terjedésnek a szubsztrátok és a módszerek költségigénye egyelőre jelentős gátakat jelent a mindennapi kutató gyakorlatban. A glikolízis és citromsavciklus működésére vonatkozóan adott energiaforrások/szubsztrátok oxidációjának összevetésével is juthatunk információkhoz.

Acetát a zsírsavak lebontásából keletkezhet endogén vagy exogén módon is (pl. a májban termelődik és a vérárammal jut a sejtekhez), majd az acetyl-CoA szintáz segítségével acetyl-CoA képződik, ami a citromsavcikluson keresztül is hasznosulhat. [36, 64]. Az acetát ilyen oxidációjának jelentőségére (mint alternatív bioenergetikai szubsztrát) több munkacsoport is felhívta már a figyelmet például primer glioblastomák, ill. különböző tumorerőmetasztázisai esetében. Az acetát hasznosításához acetyl-CoA szintáz 2 enzim expresszió szükséges, aminek magas szintje humán glioblastomákban a betegek rossz prognózisával függött össze [62, 63].

A tumorsejtek szubsztrát preferenciájának, ezen keresztül a használt domináns bioenergetikai útvonal vizsgálatához stabil és radioaktív szénizotóppal jelölt glükóz és acetát szubsztrátokat alkalmaztunk. A ^{13}C atomok beépülését követtük glikolitikus és citromsav ciklus intermedierekbe LC-MS módszerrel. HT-1080 sejtekben csökkent acetát hasznosítást, valamint a ^{13}C kismértékű malátba és citrátba való beépülését figyeltük meg, ami a citromsav ciklus kisebb aktivitására utalt. A HT-1080 fibrosarcoma sejtekben ez csökkent mitokondriális aktivitással és megváltozott mitokondriális morfológiával társult. Ezzel szemben a ZR-75.1. sejtekben mért alacsonyabb laktát-malát arányból arra következtethetünk, hogy a fokozott glikolízis mellett a mitokondriális működés is kiegyensúlyozott maradt. Ezeket az eredményeinket megerősítik az adenilát energiátöltés (AEC) vizsgálatokban kapott adatok is.

Számos metabolomikai tanulmány készült – gáz-, folyadékkromatográfiás, tömegspektrometriás vagy NMR vizsgálatokkal –, melyekben megemelkedett tejsav és csökkent citromsav ciklus metabolitok mennyiségét mérték humán tumorszövetben, illetve daganatos betegek vérplazmájában [147-149]. Fontos azonban, hogy a mai napig nem létezik egységes analitikai eljárás a metabolitok egyidejű meghatározására, többféle eljárás párhuzamos fejlesztése zajlik a különböző laborokban.

Glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) és a mitokondriális légzési lánc enzim β -F1-ATPáz expresszió vizsgálatában kapott eredményeink szerint a glikolízis és oxidatív foszforiláció arányának jellemzésére a két enzim mennyiségének meghatározása is használható. Ezt megerősítik azok az adatok is, melyek szerint emlődaganatokban a β -F1-ATPáz expresszió vizsgálata segítséget nyújthat a tumorprogresszió monitorozásában [148, 150].

Összegezve eredményeinket, a HT-1080 és a ZR-75.1 sejtek metabolikus vizsgálatában többféle módszerrel hasonló eredményekre jutottunk, így a következő módszereket javasolhatjuk a domináns bioenergetikai folyamatok vizsgálatára (**1. táblázat**):

- a) ^{14}C vagy ^{13}C -jelzett glükózból és acetátból származó $^{14}\text{CO}_2$ felszabadulás mérése, illetve utóbbi esetében a beépülés arányának meghatározása;
- b) glükóz és acetát hasznosítás vizsgálatban az adenilát energiatöltés értékeinek meghatározása, illetve a hasznosítás arányának vizsgálata;
- c) ^{13}C -jelölt laktát és malát arány meghatározás U^{13}C -glükóz jelölést követően;
- d) citrátba épült ^{13}C atomok számának, a különböző tömegszámú szénizotópokat tartalmazó citrátok mennyiségének vizsgálata $2\text{-}^{13}\text{C}$ -acetát jelölést követően;
- e) GAPDH és $\beta\text{-F1-ATPáz}$ fehérjék mennyiségének összehasonlító vizsgálata.

1. Táblázat. A HT-1080 és a ZR-75.1 modell sejt vonalakon végzett bioenergetikai módszerek eredményeinek összevetése.

Bioenergetikai vizsgálatok	HT-1080	ZR-75.1
glükózból/acetátból származó $^{14}\text{CO}_2$ felszabadulás	30,1	0,4
glükóz ill. acetát szubsztrát felhasználása mellett mérhető AEC aránya	1,39	0,88
$\text{U-}^{13}\text{C}$ -glükóz jelölést követő ^{13}C -jelölt laktát/ ^{13}C -jelölt malát aránya	13,74*	0,87*
^{13}C -acetát szubsztrát mellett a citrátba épült ^{13}C atomok száma	1-2	1-6
GAPDH/ $\beta\text{-F1-ATPáz}$	2,22**	0,87**

* moláris értékekből kalkulált arányok; ** β -aktinra normalizált fehérje expressziók aránya

5.2. Az mTOR jelút aktivitásának szerepe a bioenergetikai folyamatok szabályozásában

Az mTOR anyagcserét befolyásoló és a sejtek túlélését szabályozó szerepe jól ismert. Az emelkedett mTOR aktivitás jelentősége a malignus transzformációban már elfogadott, fontos szerepe a proliferációban, a növekedéshez szükséges bioszintetikus folyamatok összehangolásában is egyre jobban ismertté vált az utóbbi időben. Az

mTOR komplexek aktivitása szabályozza a glikolízist, a pentóz-foszfát-utat, a glutaminolízist és a hypoxia indukált faktor 1 által szabályozott folyamatokat [82, 94]. Az mTORC2 komplex fehérjét az endoplazmatikus retikulum szubkompartimentben, a mitokondrium membránjához kötötten is kimutatták, szabályozó szerepét a mitokondriális energiatermelő folyamatokban is leírták már [151].

Vizsgálatainkban az mTORC1 és az mTORC2 komplexekre jellemző fehérjék expressziós eredményei összefüggést mutattak a metabolikus méréseinkben kapott adatokkal. Ezek az mTORC1 és mTORC2 komplexek eltérő metabolikus funkcióit támasztják alá. Az ép mitokondriális struktúrájú és funkciójú ZR-75.1 sejtekben csökkent mTORC1 aktivitást, nagy mennyiségű mTORC2 komplexre utaló fehérje expressziós mintázatot figyeltünk meg. Míg a magas glikolitikus aktivitású és károsodott TCA ciklusú HT-1080 sejtekben mTORC1 komplex aktivitás dominanciát és magas GLUT1 expressziót figyeltünk meg, amelyek alátámasztja az mTORC1 komplex ismert szerepét a glikolízis szabályozásában.

Megfigyeléseink alapján, a bemutatott módszerek alkalmasak a tumorsejtek metabolikus vizsgálatára, ezek eredményei segítséget nyújthatnak megfelelő metabolikus gátlószerek tervezéséhez és/vagy felhasználásához, így az egyénre szabott terápiás beavatkozásokhoz.

5.3. Az mTORC1 gátló rapamycin kezelés csökkenti a laktát és a 2-HG termelést IDH1 mutáns HT-1080 sejtekben *in vitro* és *in vivo*

Több, a daganatsejtekben termelődő metabolitnak szerepe lehet a tumorprogresszióban például az epigenetikai szabályozásában, a jelátviteli hálózatok aktivitás változásában és ezekkel összefüggésben az anyagcsere megváltoztatásában [152-156]. Számos adat támasztja alá, hogy az onkometabolitok megjelenésével párhuzamosan megváltozó aktivitású folyamatok (például epigenetikai változások – hipermetiláció), az mTOR szabályozott folyamatokkal is kapcsolatba hozhatók [44, 153, 157, 158].

A tumorsejtekre jellemző Warburg-effektusban termelődő tejsav a mikrokörnyezetbe kerülve metabolikus szimbiózisban segítheti a tumornövekedését, az oxidatív tumorsejtek vagy stromasejtek hasznosíthatják bioenergetikai folyamataikban; emellett a felhalmozódó tejsav gátló hatást fejthet ki az immunsejtekre, valamint a mátrix

metalloproteázok termelését is fokozza, így elősegíti a migráció és a metasztázis folyamatát [27, 159]. Vizsgálatainkban igazoltuk az mTOR gátló kezelések nemcsak *in vitro*, hanem *in vivo* tejsavtermelést csökkentő hatásait. Az mTOR gátlóknak az előbbin keresztül szerepe lehet tejsav tumornövekedést támogató hatásainak mérséklésében *in vivo*. Bár természetesen ennek az mTOR gátlók ismert immunszuppresszív szerepe mellett, tumorimmunológiai szempontból kis jelentősége lehet. Egyéb, pl. mátrix metalloproteázok gátlásának, így a tumorsejt inváziós és az antimetasztatikus hatásoknak lehet ebből a szempontból nagyobb jelentősége.

Eredményeink is igazolják, hogy a laktát mellett az IDH mutáns daganatsejtek esetében az mTOR aktivitásnak a 2-hidroxi-glutarát termelésben szerepe van. Kimutattuk, hogy az mTOR inhibitorok (mTORC1 gátló rapamycin, mTORC1/2 inhibitor PP242) gátolják a tumorsejtek proliferációját, és az említett két onkometabolit (laktát és 2-HG) termelését is *in vitro* és *in vivo*.

Eredményeink arra is felhívják a figyelmet, hogy az mTOR aktivitás transzlációs hatása [44, 160] szükséges a laktát-dehidrogenáz A és glutamináz fehérjék termeléséhez, ezen keresztül támogatja a tejsavas glikolízist és a glutaminolízist. Az mTOR gátló kezelés az előbbieket miatt is gátolja a glikolízist és a glutaminolízist. Ismert, az is, hogy az mTORC1 aktivitása számos további glikolitikus enzim expresszióját szabályozza [105, 161]. Munkánkban azonban elsőként mi írtuk le, hogy az mTOR hiperaktivitásnak az IDH mutáns daganatok 2-hidroxi-glutarát termelésében is szerepe van. Leírtuk, hogy az mTOR gátlók csökkentik a glikolitikus laktát és az IDH1 mutációval összefüggő 2-HG termelést.

Egyes közlemények az mTOR aktivitás és az IDH1 mutációval összefüggő 2-HG termelés kapcsolatát más, nem humán modellekben is tanulmányozva ellentmondásos eredményeket mutatnak, ezekben a 2-HG mTOR aktivitást fokozó és gátló hatásait is leírták (genetikailag módosított glioblastoma sejtek, ill. *C. elegans* kísérletek) [162, 163]. Az alkalmazott kísérletek modelljei és körülményei (pl. kezelések időtartama és módja – jelentős, hogy hosszú távon adott mutációhoz alkalmazkodott szervezetet, sejteket vagy pl. akut 2-HG kezelések hatásait vizsgáljuk) egyaránt befolyásolhatta ezeket az eredményeket.

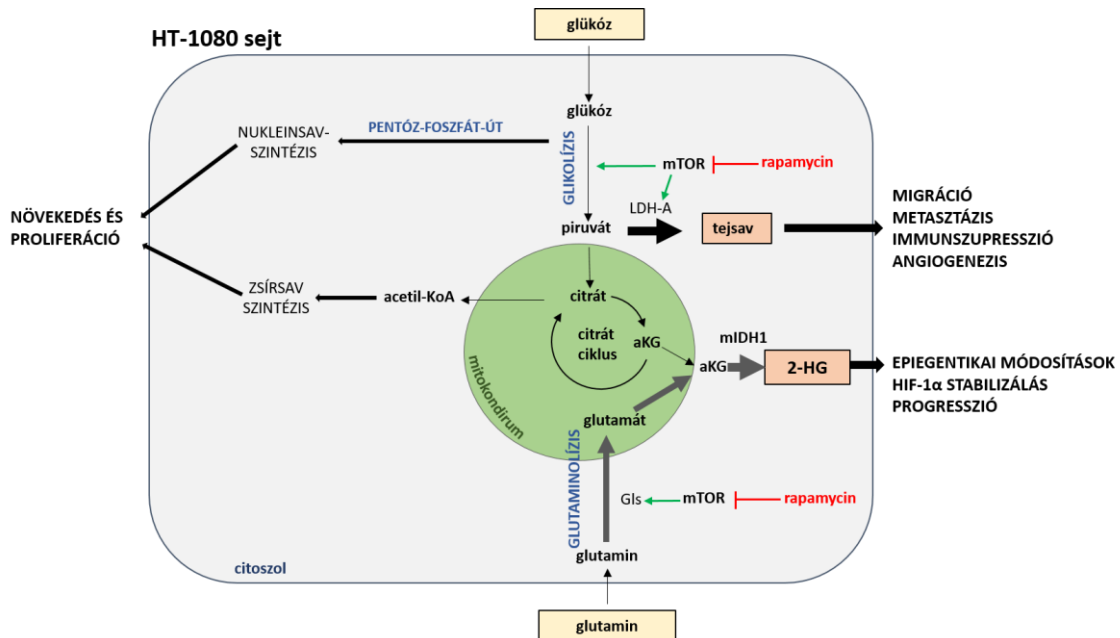
Saját vizsgálataink eredményei (endogén IDH1 mutációval rendelkező HT-1080 fibrosarcoma sejtvonallal dolgoztunk) Carbonneau és munkatársai megfigyelését

támasztják inkább alá [163], amely szerint a 2-hidroxiglutarát kezelés (2-HG oktil-észterét alkalmazták) a sejtek mTORC1 és mTORC2 aktivitását is egyaránt megemelte, és a mutáns IDH1 R132H transzfekeciót követően a mIDH1-et expresszáló mTOR aktivitása megemelkedett. Vizsgálataik szerint ennek háttérében a 2-HG KDM4A (α -ketoglutarát dependens, Jumonji családba tartozó lizin-demetiláz – a DEPTOR, ami az mTOR komplexek negatív szabályozó fehérjéje) funkciójának gátlása áll. Előbbivel jól korrelál, hogy az endogén heterozygota IDH1 mutáns HT-1080 sejtekben, a mutáció következtében hosszú ideje magas 2-HG szint mellett magas mTORC1 aktivitást mutattunk ki, és a 2-HG termelés pedig mTORC1 függőnek bizonyult. Eredményeink azt mutatják, hogy a HT-1080 sejt vonal – mTORC1 dominanciája, endogén IDH1 mutációja és glikolitikus fenotípusa miatt – ígéretes modell lehet az mTOR aktivitás és az IDH1 mutáció közötti összefüggések vizsgálatára.

A rapalógok és más mTOR gátló hatású szerek daganatellenes hatásait emelkedett mTOR aktivitású gliómákban, akut myeloid leukémiában és chondrosarcomában már korábban leírták [164]. Több rapamycin származékot és kettős mTOR inhibitorokat alkalmaznak visszatérő és terápia rezisztens akut myeloid leukémiás és gliomás páciensek körében végzett klinikai fázis vizsgálatban is [165-167]. Eredményeinkhez hasonlóan, más munkacsoportok is kimutatták, hogy a glikolízis és a glutaminolízis gátlószerek (pl. deoxiglükóz, ill. Zaprinast, BPTES) képesek csökkenteni a proliferációt *in vitro* körülmények között, viszont *in vivo* kísérletek kevésbé jelentős tumornövekedést gátló hatást mutattak [152, 168, 169]. Allen és munkatársai kimutatták, hogy az mTOR gátló rapamycin kombinálása angiogenezis gátló sunitinib-el az oxidatív és a nem oxidatív tumorsejtek metabolikus szimbiózisát gátolja. Ennek a hatásnak a jövőben akár szerepe lehet olyan rezisztencia problémák áttörésében is, melyek a metabolikus szimbiózissal és heterogenitással függenek össze [71]. Az mTOR és a glikolízis vagy a glutaminolízis gátlószereknek alkalmazása kombinációban (pl. kemoterápiás szerekkel) esetleg további terápiás előnyöket is hozhat, természetesen a várható mellékhatások figyelembevétele mellett.

Összefoglalva a rapamycin (mTORC1 inhibitor) jelentős tumornövekedést gátló hatást mutatott *in vitro* és *in vivo* endogén heterozygota IDH1 mutációval rendelkező modellünkben. Eredményeink szerint az mTOR gátlóknak a proliferáció gátló hatások mellett más, anyagcserét befolyásoló hatásai (LDH-A és glutamináz expresszióján

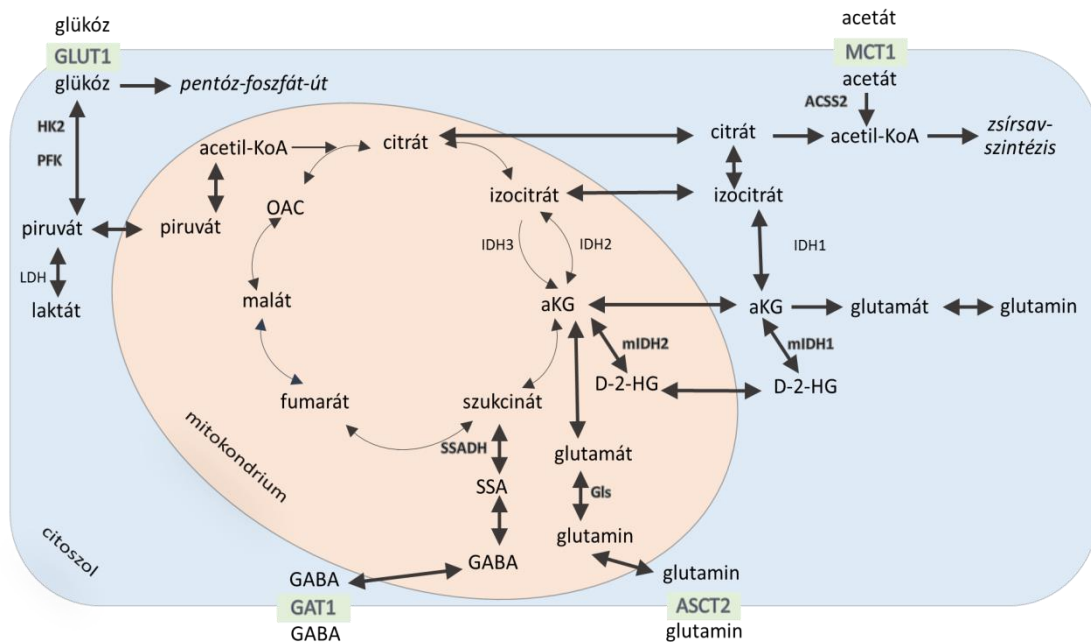
keresztül laktát és 2-HG termelés csökkenése) is lehetnek, különösen a magas glikolitikus aktivitású és IDH1 mutációval rendelkező daganatokban (**31. ábra**).



31. ábra. A magas mTORC1 aktivitású HT-1080 sejtben a rapamycin csökkenti a proliferációt, valamint a laktát és 2-HG termelést (összefoglaló ábra). A rapamycin kezelés a laktát és 2-HG onkometabolit mennyiségét csökkentette IDH1 mutáns fibrosarcoma tumorsejtekben. Ennek háttérében az mTOR transzlációs hatásainak (LDH-A és glutamináz enzim expresszió) gátlása állhat. Az ábrán a tejsav és 2-HG tumorprogressziót támogató hatásait is feltüntettem.

5.4. Gliomákra jellemző alaplégzés, glikolízis, szubsztrát oxidáció és GABA anyagcsere az IDH1 mutációval összefüggésben

Az IDH mutáció következményeinek, jelenlétével összefüggő egyéb onkogenikus jellegzetességeknek és az IDH mutációtól függetlenül bekövetkező anyagcsere-változásoknak megkülönböztethetőségének vizsgálatokor egy IDH vad típusú glioma sejtvonalt és annak mutáns IDH1 (R132H) fehérjét overexpresszáló variánsát összehasonlító vizsgálatát végeztük el. A vizsgálatokban érintett bioenergetikai folyamatokat a **32. ábrán** foglaltam össze.



32. ábra. A glioma sejtekben tanulmányozott bioenergetikai folyamatok összefoglalása. Tanulmányoztuk az anyagcserében résztvevő glikolízis, acetát hasznosítás, glutaminolízis és GABA metabolizmus enzimeit/transzportereit glioma sejtekben. A glikolízisben részt vevő: GLUT1 (glükóz transzporter 1), HK2 (hexokináz 2), PFKP (foszfofruktokináz P) és LDH (laktát-dehidrogenáz); acetát hasznosításban résztvevő: ACSS2 (acetyl-KoA szintetáz 2); glutamin felvételben és átalakításban fontos: ASCT2 (glutamin transzporter) és Gls (glutamináz); GABA oxidációban, metabolizmusban szerepet játszó: GAT1 (GABA transzporter 1), SSADH (szukcinát szemialdehid-dehidrogenáz). Az alábbi szubsztrátok oxidációját vizsgáltuk: glükóz, glutamin, acetát, malát, citrát, laktát, GABA, glutamát. OAC: oxaloacetát, SSA: szukcinát szemialdehid.

Az IDH1 mutáció, epigenetikai hatásait jól ismerjük [155, 170, 171], az IDH1 mutáns és a vad sejtek bioenergetikai különbségeiről azonban kevesebbet tudunk. Az IDH1 mutáció különböző eredetű sejtek proliferációját és túlélését [133, 172] vagy bizonyos tumorok esetében a betegek túlélését befolyásoló hatásáról sok különböző adat áll rendelkezésünkre. Gliomákban és AML-ben a mutáció prognosztikai jelentőségének különbségei jól ismertek.

Az IDH1 vad és mutáns U251 glioma sejtvonal összehasonlító vizsgálataiban azt tapasztaltuk, hogy az IDH1 mutáns sejtek alaplégzése (alap O₂ fogyasztása) szignifikánsan magasabb, mint a vad típusú sejteké. Kimutattuk, hogy a mitokondriális légzés gátlását követően a sejtek glikolitikus aktivitása nő, laktát termelés mint metabolikus kompenzáció megjelenik a sejtekben. Elsőként mutattuk ki, hogy a magasabb alaplégzés az IDH mutáció következtében megjelenő 2-HG termeléssel függ össze, továbbá az *in vitro* 2-HG kezelés és a megjelenő magas intracelluláris 2-HG szint az IDH1 mutáns sejtekhez hasonló mértékre emelte a vad típusú sejtek oxigénfogyasztását. A 2-HG kezelés után egyes TCA metabolitok (malát és α -ketoglutarát) mennyisége is emelkedett, ez az akut 2-HG kezelés ismert kompetitív és/vagy alloszterikus gátló hatásaira utal bizonyos TCA ciklus enzimek esetében [173]. Eredményeinket megerősítik azok a vizsgálatok, amelyekben CRISPR-Cas9 rendszerrel genetikailag módosított IDH mutáns HCT116 colon carcinoma sejtvonalban a vad típusú glioma sejtek Warburg-fenotípusával szemben a mutáns sejtek jelentős mértékű oxidatív foszforilációját írták le [172, 174].

A 2-HG kezelést követően kimutatott intracelluláris glutamát mennyiségének csökkenése az IDH1 mutáns sejtekben a glutamin–glutamát– α -ketoglutarát (aKG)-2-HG átalakulás folyamatával áll összefüggésben. Az IDH1 mutáns sejtekben magasabb a glutamináz expresszió és csökkent a glutamin oxidációs képesség. A sejtek a glutamint elsősorban a 2-HG onkometabolit-termelésben hasznosítják, amit 24 órás U-¹³C-glutamin jelöléses vizsgálatunk is alátámasztott, bár eredményeink szerint az IDH1 mutáns sejtek más forrásokat (pl. glükóz vagy acetát) is használhatnak 2- hidroxiglutarát termelésben. Eredményeinkhez hasonlóan a korábbi MRI és más spektrometriai vizsgálatok is elsősorban a glutamin 2-HG forrás szerepét hangsúlyozzák [175], de felhívják a figyelmet a glükóz alacsony turnoveréből keletkező 2-HG jelentőségére is gliomasejtekben. Tudomásunk szerint vizsgálatainkban először írtuk le, hogy az acetát is hozzájárulhat a 2-HG termeléshez az IDH1 mutáns daganatsejtekben, ami alapján megfontolandó, hogy az acetát nemcsak mint bioenergetikai szubsztrát, hanem mint alternatív 2-HG forrás is szerepet játszhat a tumorsejtekben.

A vad típusú és a mutáns IDH1 sejtekben a különböző, TCA ciklus feltöltését szolgáló szubsztrátok oxidációját is megvizsgáltuk. A malát hozzáadása emelte a sejtek oxigén fogyasztását. Nem tudtuk azonban alátámasztani azokat az *in silico*

eredményeket, amelyek az LDH-B mRNS expressziós különbségek alapján magasabb laktát oxidációt valószínűsítettek az IDH mutáns gliomáknál [174]. A sejtek laktát és acetát oxidációjában nem figyeltünk meg szignifikáns különbségeket.

A GABA-nak – mint neurotranszmitternek –, a GABA receptor működésnek is lehet szerepe bizonyos, akár nem idegrendszeri daganatok (pl. emlődaganatok) kialakulásában, de erre vonatkozóan az irodalomban ellentmondásos eredményeket találunk [176-181]. Kimutattuk, hogy a glutamin, a glutamát és a GABA jelentős alaplégzés fokozódást eredményez vad típusú IDH1-gyel rendelkező U251 sejtekben (közel 20%-os emelkedés), de ez a növekedés a mutáns IDH1 sejtek alaplégzésében elmaradt. Ezek az eredményeink a glutamin és a GABA szubsztrátok bioenergetikai hasznosító folyamatainak jelentőségére utalnak a nem IDH mutáns glioma sejtekben. *In vitro* vizsgálatainkban a GABA – mint energiaszubsztrát – oxidációját és kapcsolatát az SSADH expressziójával elsőként mutattuk ki. Az SSADH-t expresszáló U251 sejtvonal hosszú távú GABA kezelésének proliferációt fokozó hatásait is kimutattuk. Ezt a GABA indukált proliferáció fokozó hatást a kombinációban adott 2-HG kezelés azonban felfüggesztette *in vitro*. Ezek az adatok, a vizsgálatainkban glioma sejtekben elsőként kimutatott GABA oxidációs képesség, illetve a humán glioma minták közel 100%-ában kimutatott fokozott SSADH fehérje expresszió alátámasztja a glioma sejtek GABA oxidációra képes astrocyta eredetét. Eredményeink jelentőségét mutatja az a friss tanulmány, amelyik a GHB (gamma hidroxibutirát – GABA anyagcsere egyik intermedierje) akkumulációra, ill. *in vitro* GHB kezeléssel összefüggő SSADH expresszió csökkenés potenciális szerepére hívja fel a figyelmet a kevésbé agresszív IDH vad típusú glioblastoma sejtekben [182]. A közelmúltban több közlemény is megjelent, amelyek a GABA tumorsejtek növekedését támogató potenciális bioenergetikai szubsztrát szerepének hatásait írják le [183, 184, 185].

A humán gliomák vizsgálata közben összehasonlítottunk 3 originális IDH vad glioma sejtvonal (hasonló grádusú gliomák) bizonyos metabolikus sajátosságait és jelentős eltéréseket tapasztaltunk. Kísérleteink az *in vitro* glioma modellek jól ismert korlátaira is felhívják a figyelmet, a humán minták közel 100%-át jellemző SSADH expresszió csak az U251 sejtvonalban volt megfigyelhető. Kimutattuk, hogy a glioma sejtvonalak szubsztrát-oxidációs és glikolitikus képességei összefügghetnek az *in vitro* - és így feltételezhetően *in vivo* – körülmények között mutatott növekedésük ütemével is.

Saját eredményeinkhez hasonlóan számos más daganat metabolikus jellemzésének eredménye alátámasztja azt, hogy a tumorsejtek metabolikus adaptációs képességgel rendelkeznek, ami elősegíti a sejtek proliferációját és túlélését. Ezek az adatok mutatják, hogy a tumorszövet metabolikus szimbiózisát érdemes vizsgálni a jövőben *in vivo* modellek és szöveti biopsziás minták segítségével új terápiás megoldások keresésekor [4].

Malignus daganatokban a metabolikus útvonalak jellemzése, így a glioma sejtek is *in vitro* és *in vivo* metabolikus vizsgálatai segíthetnek abban, hogy a metabolikus adaptáció és ezen belül a sejtek proliferációjával vagy a túlélésével összefüggő bioenergetikai útvonalak közötti eltolódásokat, átrendeződéseket megértsük és megfelelő, új terápiás célpontokat határozzunk meg ebben a jelenleg még gyakorlatilag nem, vagy csak kivételes esetben gyógyítható daganattípusban.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Sejtek bioenergetikai és mTOR aktivitás jellemzésével kapcsolatos metabolikus vizsgálatok:

- 1) Az LC-MS mérések alkalmasak a sejtek intracelluláris metabolit koncentráció viszonyainak; U-¹³C-glükóz és a 2-¹³C-acetát jelölést követően pedig a jelölt szénatomok metabolitokban megjelenő számbeli és mennyiségi változásának, a daganatsejtek domináns anyagcsere útvonalainak jellemzésére.
 - a) A modellként vizsgált ZR-75.1 emlőcarcinoma sejtvonalat jelentős acetát hasznosító képesség és a TCA ciklus fokozott aktivitása;
 - b) míg a HT-1080 fibrosacroma sejtvonalat inkább a tejsavas glikolízis túlsúlya és károsodott mitokondriális funkciók jellemzik.
- 2) A 2-HG onkometabolit-termelés forrása jól vizsgálható különböző stabil izotóp jelzett szubsztrátok és LC-MS segítségével:
 - a) Az IDH1 mutáns HT-1080, ill. glioma sejtekben a 2-HG termelés forrása elsősorban a glutamin;
 - b) de a glioma sejtekben az acetát is lehet, így az acetát alternatív 2-HG forrásként támogathatja a tumorigenezist.
- 3) Az mTOR aktivitás összefüggést mutat a sejtek metabolikus aktivitásával és onkometabolit-termelésével.
 - a) A HT-1080 sejtek metabolikus jellegzetességei összefüggést mutatnak az mTORC1 aktivitás dominanciájával, illetve heterozygota IDH1 mutáns genotípusával, 2-HG onkometabolit-termelésével.
 - b) A ZR-75.1 sejteket a kiegyensúlyozott glikolítikus és mitokondriális anyagcsere-folyamatok mellett magas mTORC2 komplex aktivitás jellemzi.
 - c) A HT-1080 sejtek mTORC1 inhibitor érzékenyek, a rapamycin *in vitro* és *in vivo* proliferáció gátló hatásai mellett az onkometabolitok termelését is csökkenti a HT-1080 tumorsejtekben és szövetekben.
- 4) A 2-HG és laktát termelés mTORC1 és ezzel összefüggésben glutamináz illetve LDH-A aktivitás függő.

Gliomák bioenergetikai jellemzésének és szubsztrát-oxidációjának, valamint IDH1 mutációval összefüggő anyagcsere-változásainak vizsgálata:

- 1) A glioma sejtek egyedi szubsztrát oxidációs és glikolitikus kapacitással rendelkeznek.
 - a) A hasonló grádusú, nem IDH mutáns glioma sejtvonalak alap oxidációs és glikolitikus funkciói eltérést mutatnak;
 - b) az IDH1 mutáns glioma sejtvonala magasabb oxigénfogyasztással és alacsonyabb glikolitikus kapacitással rendelkezik, mint originális vad típusú párja;
 - c) Az SSADH expressziót mutató nem IDH1 mutáns glioma sejtvonala a GABA bioenergetikai hasznosítására, oxidációjára képes, míg az IDH1 mutáns párja nem.
 - d) Az IDH1 mutációval összefüggő 2-HG termelés gátolja a GABA oxidációt;
 - e) az SSADH expressziót mutató, nem IDH1 mutáns glioma sejtek proliferációját GABA kezeléssel fokozni lehet, és ez 2-HG kombinált kezeléssel visszafordítható.
- 2) Az általunk vizsgált humán glioma minták több mint 90 %-át IDH1 mutációs státusztól, nemtől és kortól független magas SSADH fehérje expresszió jellemzi, ami a GABA lehetséges bioenergetikai, metabolikus hasznosítására utal.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A malignus fenotípus jellemzője a tumorsejtek anyagcsere változása. Az mTOR (mammalian target of rapamycin) kináz a jelátviteli hálózat elemeként szabályozza a legkülönbözőbb sejtfunciókat, köztük a glikolízis, glutaminolízis, a bioszintetikus folyamatok és az autofágia aktivitását; hiperaktivitása a legtöbb daganatra jellemző. Humán sejtvonalak anyagcsere változásait (metabolikus profilját), szubsztrát hasznosítását, ezzel összefüggésben az mTOR aktivitásváltozásait vizsgáltam.

Metabolikus jellemzéshez analitikai módszerek, bioenergetikai profil meghatározások beállítását végeztem. mTOR gátló kezelések tumor növekedést, anyagcserét befolyásoló hatásait tanulmányoztuk *in vitro* és *in vivo*. Az IDH (izocitrát-dehidrogenáz) mutáció bioenergetikai hatásait mutáns és vad glioma sejtben vizsgáltam. Metabolitok, onkometabolitok mennyiségét tömegspektrometriai módszerekkel, különböző enzimek expresszióját és aktivitását Western blottal vagy immunhisztokémiával analizáltuk.

A HT-1080 fibrosarcoma sejtvonala glükolitikus fenotípus, károsodott TCA ciklus, IDH1 mutáció és magas mTORC1 aktivitás jellemző. Előbbiekkel ellentétben a jelentős acetát hasznosító képességgel rendelkező, ZR-75.1 emlőcarcinoma sejtvonala kiegyensúlyozott glükolitikus, mitokondriális funkciók és jelentős mTORC2 aktivitás jellemző. A rapamycin kezelés a HT-1080 sejtekben csökkenti a laktát és az IDH1 mutációval összefüggő 2-HG (2-hidroxiglutarát) onkometabolitok termelését, a laktát-dehidrogenáz-A és a glutamináz expresszió gátlásával összefüggésben.

IDH1 mutáns és vad U251 glioma sejteket összehasonlítva, az IDH1 mutáns U251 sejtek alacsonyabb glutamin, glutamát, malát és GABA (gamma-amino-vajsav) oxidációs képességét mutattuk ki. A mutáns sejtekben a 2-HG csökkenti a glutamin és a GABA oxidációt. Az U251 és más vizsgált glioma sejtvonalakban a GABA oxidációs képesség összefüggést mutatott az SSADH (szukcinát szemialdehid-dehidrogenáz) fehérje expresszióval. GABA jelenlétében az U251 sejtek növekedése fokozódott, ez azonban 2-HG kezelés mellett elmaradt. Humán glioma minták jellemzésekor az esetek több mint 90%-ában IDH1 mutációs státusztól, nemtől és kortól független fokozott SSADH fehérje expressziót figyeltünk meg, ennek klinikai jelentősége is lehet.

A tumorok hasonló metabolikus profil vizsgálata segítségével a jövőben további eddig nem ismert metabolikus célpontok azonosíthatók és ezek segíthetik a terápia rezisztenciát áttörő, egyénre szabott terápiák fejlesztését.

8. SUMMARY

Altered cellular metabolism is a hallmark of cancer cells. mTOR ("mammalian target of rapamycin"), as a part of the signalling network, regulates various cell functions; it has regulatory role in glycolysis, glutaminolysis, biosynthetic processes and autophagy. mTOR hyperactivity is characteristic for the majority of tumour cells. The metabolic alterations (metabolic profile) and substrate utilisation of human cell lines in correlation to mTOR activity were studied.

Certain analytical measurements and bioenergetic profile analyses were established for metabolic characterisation. Different substrate utilising cell lines were applied in metabolic characterisation. The anti-growth and metabolic effects of mTOR inhibitors were studied *in vitro/in vivo*. The bioenergetic effects of the IDH (isocitrate dehydrogenase) mutation were assessed in mutant and wild-type glioma cell line pair. The amount of metabolites/oncometabolites was measured by mass-spectrometry, the expression and activity of certain metabolic enzymes were studied using Western blot or immunohistochemistry.

HT-1080 fibrosarcoma cell line has a glycolytic phenotype, damaged TCA cycle, IDH1 mutation and high mTORC1 activity. On the other hand, ZR-75.1 breast cancer cell line with acetate utilising capacity was characterised by balanced glycolytic-mitochondrial functions and significant mTORC2 activity. Rapamycin treatment decreased the production of lactate and the IDH mutation related 2-HG (2-hydroxyglutarate) oncometabolite through translational effects (reducing lactate dehydrogenase A and glutaminase expressions) in HT-1080 cells.

Comparative analyses of mutant and wild-type U251 glioma cells revealed that the mutant cells have lower glutamine, glutamate, malate and GABA (gamma-aminobutyric acid) oxidation capacity. 2-HG reduces glutamine and GABA oxidation in mutant U251 cells. GABA oxidation was correlated to SSADH (succinic semialdehyde dehydrogenase) enzyme expression in U251 and other studied glioma cells. These have higher proliferation rate in the presence of GABA, however, 2-HG treatment slowed down their growth. SSADH protein overexpression was detected in ~ 90% of human glioma samples unrelated to IDH1 mutation, gender or age which could have clinical importance.

Performing such metabolic profile analyses could help to find further new metabolic targets, break through therapy resistance and develop personalised treatments.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- 1, Hanahan D, Weinberg RA. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1):57-70.
- 2, Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646-74.
- 3, Pavlova NN, Thompson CB. (2016) The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*, 23(1):27-47.
- 4, Martinez-Outschoorn UE, Peiris-Pagés M, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP. (2017) Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat Rev Clin Oncol*, 14(2):11-31.
- 5, Soga T. (2013) Cancer metabolism: key players in metabolic reprogramming. *Cancer Sci*, 104(3):275-81.
- 6, DeBerardinis RJ, Chandel NS. (2016) Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv*, 2(5):e1600200.
- 7, Cairns R, Harris IS, Mak TW. (2011) Regulation of cancer metabolism. *Nature Rev*, 11(2):85-95.
- 8, Morin A, Letouzé E, Gimenez-Roqueplo AP, Favier J. (2014) Oncometabolites-driven tumorigenesis: From genetics to targeted therapy. *Int J Cancer*, 135(10):2237-48.
- 9, Nowicki S, Gottlieb E. (2015) Oncometabolites: tailoring our genes. *FEBS J*, 282(15):2796-805.
- 10, Corrado M, Scorrano L, Campello S. (2016) Changing perspective on oncometabolites: from metabolic signature of cancer to tumorigenic and immunosuppressive agents. *Oncotarget*, 7(29):46692-46706.
- 11, Yu JS, Cui W. (2016) Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development*, 143(17):3050-60.
- 12, Warburg O, Posener K, Negelein E. (1924) Ueber den stoffwechsel der tumoren. *Biochem Z*, 152:319-344.
- 13, Warburg O. (1956) On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191):309-14.

- 14, Crabtree HG. (1929) Observations on the carbohydrate metabolism of tumors. *Biochem. J*, 23(3):536-545.
- 15, Diaz-Ruiz R, Rigoulet M, Devin A. (2011) The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochim Biophys Acta*, 1807(6):568-76.
- 16, Chattopadhyay E, Roy B. (2017) Altered Mitochondrial Signalling and Metabolism in Cancer. *Front Oncol*, 7:43.
- 17, Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, Fleming MD, Schreiber SL, Cantley LC. (2008) The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*, 452(7184):230-3.
- 18, Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930):1029-1033.
- 19, Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC, Marks KM, Prins RM, Ward PS, Yen KE, Liao LM, Rabinowitz JD, Cantley LC, Thompson CB, Vander Heiden MG, Su SM. (2009) Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*, 462(7274):739-44.
- 20, Gatenby RA. and Gawlinski ET. (2003) The glycolytic phenotype in carcinogenesis and tumor invasion: insights through mathematical models. *Cancer Res*, 63(14):3847-3854.
- 21, Vazquez A, Liu J, Zhou Y, Oltvai ZN. (2010) Catabolic efficiency of aerobic glycolysis: the Warburg effect revisited. *BMC Syst Biol*, 4:58.
- 22, Liberti MV, Locasale JW. (2016) The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci*, 41(3):211-218.
- 23, Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. (2011) Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer*, 11(5): 325-337.

- 24, Guppy M, Leedman P, Zu X, Russell V. (2002) Contribution by different fuels and metabolic pathways to the total ATP turnover of proliferating MCF-7 breast cancer cells. *Biochem J*, 364(Pt 1):309-315.
- 25, Zheng J. (2012) Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review). *Oncol Lett*, 4(6):1151-1157.
- 26, Sonveaux P., Végran F, Schroeder T, Wergin MC, Verrax J, Rabbani ZN, DeSaedeleer CJ, Kennedy KM, Diepart C, Jordan BF, Kelley MJ, Gallez B, Wahl ML, Feron O, Dewhirst MW. (2008) Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest*, 118(12):3930–42.
- 27, Payen VL, Porporato PE, Baselet B, Sonveaux P. (2016) Metabolic changes associated with tumor metastasis, part 1: tumor pH, glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Cell Mol Life Sci*, 73(7):1333-48.
- 28, Romero-Garcia S, Moreno-Altamirano MM, Prado-Garcia H, Sánchez-García FJ. (2016) Lactate Contribution to the Tumor Microenvironment: Mechanisms, Effects on Immune Cells and Therapeutic Relevance. *Front Immunol*, 7:52.
- 29, Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, Flomenberg N, Witkiewicz AK, Frank PG, Casimiro MC, Wang C, Fortina P, Addya S, Pestell RG, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. (2009) The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle*, 8(23):3984-4001.
- 30, Marchiq I, Pouysségur J. (2016) Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate/H⁺ symporters. *J Mol Med (Berl)*, 94(2):155-171.
- 31, Van Hée VF, Pérez-Escuredo J, Cacace A, Copetti T, Sonveaux P. (2015) Lactate does not activate NF- κ B in oxidative tumor cells. *Front Pharmacol*, 6:228.
- 32, Goodwin ML, Gladden LB, Nijsten MW, Jones KB. (2015) Lactate and cancer: revisiting the warburg effect in an era of lactate shuttling. *Front Nutr*, 1:27.
- 33, Akram M. (2014) Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. *Cell Biochem Biophys*, 68(3):475-8.

- 34, Anderson NM, Mucka P, Kern JG, Feng H. (2018) The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism. *Protein Cell*, 9(2):216-237.
- 35, Cetinbas NM, Sudderth J, Harris RC, Cebeci A, Negri GL, Yılmaz ÖH, DeBerardinis RJ, Sorensen PH. (2016) Glucose-dependent anaplerosis in cancer cells is required for cellular redox balance in the absence of glutamine. *Sci Rep*, 6:32606.
- 36, Corbet C, Feron O. (2015) Metabolic and mind shifts: from glucose to glutamine and acetate addictions in cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 18(4):346-53.
- 37, Sajnani K, Islam F, Smith RA, Gopalan V, Lam AK. (2017) Genetic alterations in Krebs cycle and its impact on cancer pathogenesis. *Biochimie*, 135:164-172.
- 38, Sullivan LB, Gui, DY, Vander Heiden MG. (2016) Altered metabolite levels in cancer: implications for tumour biology and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 16(11):680-693.
- 39, Chang CY, McDonnell DP. (2012) Molecular pathways: the metabolic regulator estrogen-related receptor α as a therapeutic target in cancer. *Clin Cancer Res*, 18(22):6089-95.
- 40, Altman BJ, Stine ZE, Dang CV. (2016) From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat. Rev*, 16(10):619-34.
- 41, Villar VH, Merhi F, Djavaheiri-Mergny M, Durán RV. (2015) Glutaminolysis and autophagy in cancer. *Autophagy*, 11(8):1198-1208.
- 42, Zhu L, Ploessl K, Zhou R, Mankoff D, Kung HF. (2017) Metabolic Imaging of Glutamine in Cancer. *J Nucl Med*, 58(4):533-537.
- 43, Maus A, Peters GJ. (2017) Glutamate and α -ketoglutarate: key players in glioma metabolism. *Amino Acids*, 49(1):21-32.
- 44, Collins RRJ, Patel K, Putnam WC, Kapur P, Rakheja D. (2017) Oncometabolites: A New Paradigm for Oncology, Metabolism, and the Clinical Laboratory. *Clin Chem*, 63(12):1812-1820.
- 45, Sciacovelli M, Gonçalves E, Johnson TI, Zecchini VR, da Costa AS, Gaude E, Drubbel AV, Theobald SJ, Abbo SR, Tran MG, Rajeeve V, Cardaci S, Foster S, Yun H, Cutillas P, Warren A, Gnanapragasam V, Gottlieb E, Franze K, Huntly B, Maher ER,

Maxwell PH, Saez-Rodriguez J, Frezza C. (2016) Fumarate is an epigenetic modifier that elicits epithelial-to-mesenchymal transition. *Nature*, 537(7621):544-547.

46, Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim SH, Ito S, Yang C, Wang P, Xiao MT, Liu LX, Jiang WQ, Liu J, Zhang JY, Wang B, Frye S, Zhang Y, Xu YH, Lei QY, Guan KL, Zhao SM, Xiong Y. (2011) Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell*, 19(1):17-30.

47, Saxena N, Maio N, Crooks DR, Ricketts CJ, Yang Y, Wei MH, Fan TW, Lane AN, Sourbier C, Singh A, Killian JK, Meltzer PS, Vocke CD, Rouault TA, Linehan WM. (2016) SDHB-Deficient Cancers: The Role of Mutations That Impair Iron Sulfur Cluster Delivery. *J Natl Cancer Inst*, 108(1).

48, Kluckova K, Tennant DA. (2018) Metabolic implications of hypoxia and pseudohypoxia in pheochromocytoma and paraganglioma. *Cell Tissue Res*, 372(2):367-378.

49, Dang L, Yen K, Attar EC. (2016) IDH mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics. *Ann Oncol*, 27(4):599-608.

50, Molenaar RJ, Maciejewski JP, Wilmink JW, van Noorden CJF. (2018) Wild-type and mutated IDH1/2 enzymes and therapy responses. *Oncogene*, 37(15):1949-1960.

51, Oldham WM, Clish CB, Yang Y, Loscalzo J. (2015) Hypoxia-Mediated Increases in L-2-hydroxyglutarate Coordinate the Metabolic Response to Reductive Stress. *Cell Metab*, 22(2):291-303.

52, Turkalp Z, Karamchandani J, Das S. (2014) IDH mutation in glioma: new insights and promises for the future. *JAMA Neurol*, 71(10):1319-25.

53, Dang L, Su SM. (2017) Isocitrate Dehydrogenase Mutation and (R)-2-Hydroxyglutarate: From Basic Discovery to Therapeutics Development. *Annu Rev Biochem*, 86:305-331.

54, Mondesir J, Willekens C, Touat M, de Botton S. (2016) IDH1 and IDH2 mutations as novel therapeutic targets: current perspectives. *J Blood Med*, 7:171-80.

- 55, Jäkel S, Dimou L. (2017) Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Front Cell Neurosci*, 11:24.
- 56, Lin AL, DeAngelis LM. (2017) Reappraising the 2016 WHO classification for diffuse glioma. *Neuro Oncol*, 19(5):609-610.
57. Pisapia DJ. (2017) The Updated World Health Organization Glioma Classification: Cellular and Molecular Origins of Adult Infiltrating Gliomas. *Arch Pathol Lab Med*, 141(12):1633-1645.
- 58, Waitkus MS, Diplas BH, Yan H. (2016) Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas. *Neuro-Oncology*, 18(1):16-26.
- 59, Cloughesy TF, Cavenee WK, Mischel PS. (2014) Glioblastoma: from molecular pathology to targeted treatment. *Annu Rev Pathol*, 9:1-25.
- 60, Mesti T, Ocvirk J. (2016) Malignant gliomas: old and new systemic treatment approaches. *Radiol Oncol*, 50(2):129-38.
- 61, Richardson TE, Snuderl M, Serrano J, Karajannis MA, Heguy A, Oliver D, Raisanen JM, Maher EA, Pan E, Barnett S, Cai C, Habib AA, Bachoo RM, Hatanpaa KJ. (2017) Rapid progression to glioblastoma in a subset of IDH-mutated astrocytomas: a genome-wide analysis. *J Neurooncol*, 133(1):183-192.
- 62, Mashimo T, Pichumani K, Vemireddy V, Hatanpaa KJ, Singh DK, Sirasanagandla S, Nannepaga S, Piccirillo SG, Kovacs Z, Foong C, Huang Z, Barnett S, Mickey BE, DeBerardinis RJ, Tu BP, Maher EA, Bachoo RM. (2014) Acetate is a bioenergetic substrate for human glioblastoma and brain metastases. *Cell*, 159(7):1603-14.
- 63, Comerford SA, Huang Z, Du X, Wang Y, Cai L, Witkiewicz AK, Walters H, Tantawy MN, Fu A, Manning HC, Horton JD, Hammer RE, McKnight SL, Tu BP. (2014) Acetate dependence of tumors. *Cell*, 159(7):1591-602.
- 64, Schug ZT, Vande Voorde J, Gottlieb E. (2016) The metabolic fate of acetate in cancer. *Nat Rev Cancer*, 16(11):708-717.
- 65, Schousboe A, Bak LK, Waagepetersen HS. (2013) Astrocytic Control of Biosynthesis and Turnover of the Neurotransmitters Glutamate and GABA. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 4:102.

- 66, Yogeewari P, Sriram D, Vaigundaragavendran J. (2005) The GABA shunt: an attractive and potential therapeutic target in the treatment of epileptic disorders. *Curr Drug Metab*, 6(2):127-39.
- 67, Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*, 131(6):803-20.
- 68, Perret C. (2013) General mechanisms of cancer cell metabolic adaptation. *Ann Endocrinol (Paris)*, 74(2):69-70
- 69, Eales KL, Hollinshead KE, Tennant DA. (2016) Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis*, 5:e190.
- 70, Nakazawa MS, Keith B, Simon MC. (2016) Oxygen availability and metabolic adaptations. *Nat Rev Cancer*, 16(10):663-73.
- 71, Allen E, Miéville P, Warren CM, Saghafinia S, Li L, Peng MW, Hanahan D. (2016) Metabolic Symbiosis Enables Adaptive Resistance to Anti-angiogenic Therapy that Is Dependent on mTOR Signaling. *Cell Rep*, 15(6):1144-60.
- 72, Şimşek E, Kim M. (2018) The emergence of metabolic heterogeneity and diverse growth responses in isogenic bacterial cells. *ISME J*, 12(5):1199-1209.
- 73, Robertson-Tessi M, Gillies RJ, Gatenby RA, Anderson AR. (2015) Impact of metabolic heterogeneity on tumor growth, invasion, and treatment outcomes. *Cancer Res*, 75(8):1567-79.
- 74, Gentric G, Mieulet V, Mechta-Grigoriou F. (2017) Heterogeneity in Cancer Metabolism: New Concepts in an Old Field. *Antioxid Redox Signal*, 26(9):462-485.
- 75, Sengupta D, Pratz G. (2016) Imaging metabolic heterogeneity in cancer. *Mol Cancer*, 15:4.
- 76, Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, Zhuang H, Cinalli RM, Alavi A, Rudin CM, Thompson CB. (2004) Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res*, 64(11):3892-9.

- 77, Semenza GL. (2009) Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Semin Cancer Biol*, 19(1):12-6.
- 78, Wolpaw AJ, Dang CV. (2018) Exploiting Metabolic Vulnerabilities of Cancer with Precision and Accuracy. *Trends Cell Biol*, 28(3):201-212.
- 79, Hobbs GA, Der CJ, Rossman KL. (2016) RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *J Cell Sci*, 129(7):1287-92.
- 80, Zhang C, Liu J, Liang Y, Wu R, Zhao Y, Hong X, Lin M, Yu H, Liu L, Levine AJ, Hu W, Feng Z. (2013) Tumour-associated mutant p53 drives the Warburg effect. *Nat Commun*, 4:2935.
- 81, Gnanapradeepan K, Basu S, Barnoud T, Budina-Kolomets A, Kung CP, Murphy ME. (2018) The p53 Tumor Suppressor in the Control of Metabolism and Ferroptosis. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9:124.
- 82, Morita M, Gravel SP, Hulea L, Larsson O, Pollak M, St-Pierre J, Topisirovic I. (2015) mTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity and proliferation. *Cell Cycle*, 14:473-80.
- 83, Sebestyén A, Hujber Z, Jeney A, Kopper L. (2016) Tumormetabolizmus – „metabolikus újraprogramozás” – anyagcsere szabályozás változásai és jelentősége daganatokban. *Klin. Onk*, 3(1):52-58.
- 84, Zhao Y, Butler EB, Tan M. (2013) Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell Death Dis*, 4:e532.
- 85, Luengo A, Gui DY, Vander Heiden MG. (2017) Targeting Metabolism for Cancer Therapy. *Cell Chem Biol*, 24(9):1161-1180.
- 86, Hay N. (2016) Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nat Rev Cancer*, 16(10):635-49.
- 87, Seltzer MJ, Bennett BD, Joshi AD, Gao P, Thomas AG, Ferraris DV, Tsukamoto T, Rojas CJ, Slusher BS, Rabinowitz JD, Dang CV, Riggins GJ. (2010) Inhibition of glutaminase preferentially slows growth of glioma cells with mutant IDH1. *Cancer Res*, 70(22):8981-7.

- 88, Gross MI, Demo SD, Dennison JB, Chen L, Chernov-Rogan T, Goyal B, Janes JR, Laidig GJ, Lewis ER, Li J, Mackinnon AL, Parlati F, Rodriguez ML, Shwonek PJ, Sjogren EB, Stanton TF, Wang T, Yang J, Zhao F, Bennett MK. (2014) Antitumor activity of the glutaminase inhibitor CB-839 in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer Ther*, 13(4):890-901.
- 89, Sheikh TN, Patwardhan PP, Cremers S, Schwartz GK. (2017) Targeted inhibition of glutaminase as a potential new approach for the treatment of NF1 associated soft tissue malignancies. *Oncotarget*, 8(55):94054-94068.
- 90, Stein EM, DiNardo CD, Pollyea DA, Fathi AT, Roboz GJ, Altman JK, Stone RM, DeAngelo DJ, Levine RL, Flinn IW, Kantarjian HM, Collins R, Patel MR, Frankel AE, Stein A, Sekeres MA, Swords RT, Medeiros BC, Willekens C, Vyas P, Tosolini A, Xu Q, Knight RD, Yen KE, Agresta S, de Botton S, Tallman MS. (2017) Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukaemia. *Blood*, 130(6):722-731.
- 91, Sabatini DM. (2006) mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer*, 6(9):729-734.
- 92, Zoncu R, Efeyan A, and Sabatini DM. (2011) MTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(1):21-35.
- 93, Laplante M. and Sabatini DM. (2013) Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *J Cell Sci*, 126 (Pt 8):1713-1719.
- 94, Cornu M, Albert V, Hall MN. (2013) mTOR in aging, metabolism, and cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 23(1):53-62.
- 95, Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. (2017) The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell*, 170(4):605-635.
- 96, Shimobayashi M, Hall MN. (2014) Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(3):155-62.
- 97, Yang G, Murashige DS, Humphrey SJ, James DE. (2015) A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation. *Cell Rep*, 12(6):937-943.
- 98, Albert V, Hall MN. (2015) mTOR signaling in cellular and organismal energetics. *Curr Opin Cell Biol*, 33:55-66.

- 99, Feng Z, Hu W, de Stanchina E, Teresky AK, Jin S, Lowe S, Levine AJ. (2007) The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Res*, 67(7):3043-53.
- 100, Saxton RA, Sabatini DM. (2017) mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 169(2):361-371.
- 101, Kalyanaraman B, Cheng G, Hardy M, Ouari O, Bennett B, Zielonka J. (2018) Teaching the basics of reactive oxygen species and their relevance to cancer biology: Mitochondrial reactive oxygen species detection, redox signaling, and targeted therapies. *Redox Biol*, 15:347-362.
- 102, Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, Carr SA, Sabatini DM. (2007) PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell*, 25(6):903-15.
- 103, Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, Gray NS, Sabatini DM. (2009) DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*, 137(5):873-86.
- 104, Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, Leever S, Griffiths JR, Chung YL, Schulze A. (2008) SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab*, 8(3):224-36.
- 105, Düvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, Souza AL, Triantafellow E, Ma Q, Gorski R, Cleaver S, Vander Heiden MG, MacKeigan JP, Finan PM, Clish CB, Murphy LO, Manning BD. (2010) Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell*, 39(2):171-83.
- 106, Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 13(2):132-141.
- 107, Lien EC, Lyssiotis CA, Cantley LC. (2016) Metabolic Reprogramming by the PI3K-Akt-mTOR Pathway in Cancer. *Recent Results Cancer Res*, 207:39-72.
- 108, Perl A. (2015) mTOR activation is a biomarker and a central pathway to autoimmune disorders, cancer, obesity, and aging. *Ann N Y Acad Sci*, 1346(1):33-44.

- 109, Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, Hall MN. (2004) Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*, 6(11):1122-1128.
- 110, Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307(5712):1098-1101.
- 111, Cheng SC, Quintin J, Cramer RA, Shepardson KM, Saeed S, Kumar V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Martens JH, Rao NA, Aghajani-refah A, Manjeri GR, Li Y, Ifrim DC, Arts RJ, van der Veer BM, Deen PM, Logie C, O'Neill LA, Willems P, van de Veerdonk FL, van der Meer JW, Ng A, Joosten LA, Wijmenga C, Stunnenberg HG, Xavier RJ, Netea MG. (2014) mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science*, 345(6204):1250684.
- 112, Courtney R, Ngo DC, Malik N, Ververis K, Tortorella SM, Karagiannis TC. (2015) Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. *Mol Biol Rep*, 42(4):841-51.
- 113, Ben-Sahra I, Howell JJ, Asara JM, Manning BD. (2013) Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1. *Science*, 339(6125):1323-8.
- 114, Panchaud N, Peli-Gulli MP, De Virgilio C. (2013) Amino acid deprivation inhibits TORC1 through a GTPase-activating protein complex for the Rag family GTPase Gtr1. *Sci Signal*, 6(277):ra42.
- 115, Masui K, Cavenee WK, Mischel PS. (2014) mTORC2 in the center of cancer metabolic reprogramming. *Trends Endocrinol Metab*, 25:364-373.
- 116, Shepherd C, Banerjee L, Cheung CW, Mansour MR, Jenkinson S, Gale RE, Khwaja A. (2013) PI3K/mTOR inhibition upregulates NOTCH-MYC signalling leading to an impaired cytotoxic response. *Leukaemia*, 27(3):650-60.
- 117, Kocalis HE, Hagan SL, George L, Turney MK, Siuta MA, Laryea GN, Morris LC, Muglia LJ, Printz RL, Stanwood GD, Niswender KD. (2014) Rictor/mTORC2 facilitates central regulation of energy and glucose homeostasis. *Mol Metab*, 3(4):394-407.

- 118, Hagiwara A, Cornu M, Cybulski N, Polak P, Betz C, Trapani F, Terracciano L, Heim MH, Rüegg MA, Hall MN. (2012) Hepatic mTORC2 activates glycolysis and lipogenesis through Akt, glucokinase, and SREBP1c. *Cell Metab*, 15(5):725-38.
- 119, Xie J, Wang X, Proud CG. (2016) mTOR inhibitors in cancer therapy. *F1000Res*, 5. pii: F1000 Faculty Rev-2078.
- 120, Porta C, Paglino C, Mosca A. (2014) Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol*, 4:64.
- 121, Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS, Schreiber SL. (1994) A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*, 369(6483):756-8.
- 122, Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH. (1994) RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*, 78(1):35-43.
- 123, Zheng Y, Jiang Y. (2015) mTOR Inhibitors at a Glance. *Mol Cell Pharmacol*, 7(2):15-20.
- 124, Meng LH, Zheng XF. (2015) Toward rapamycin analog (rapalog)-based precision cancer therapy. *Acta Pharmacol Sin*, 36(10):1163-9.
- 125, Buti S, Leonetti A, Dallatomasina A, Bersanelli M. (2016) Everolimus in the management of metastatic renal cell carcinoma: an evidence-based review of its place in therapy. *Core Evid*, 11:23-36.
- 126, Kaplan B, Qazi Y, Wellen JR. (2014) Strategies for the management of adverse events associated with mTOR inhibitors. *Transplant Rev (Orlando)*, 28(3):126-33.
- 127, Johnson SC, Kaeberlein M. (2016) Rapamycin in aging and disease: maximizing efficacy while minimizing side effects. *Oncotarget*, 7(29):44876-44878.
- 128, Flemming A. (2016) Cancer: Bivalent mTOR inhibitors - the next generation. *Nat Rev Drug Discov*, 15(7):454-5.
- 129, Li X, Wu C, Chen N, Gu H, Yen A, Cao L, Wang E, Wang L. (2016) PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. *Oncotarget*, 7(22):33440-50.

- 130, Rodrik-Outmezguine VS, Okaniwa M, Yao Z, Novotny CJ, McWhirter C, Banaji A, Won H, Wong W, Berger M, de Stanchina E, Barratt DG, Cosulich S, Klinowska T, Rosen N, Shokat KM. (2016) Overcoming mTOR resistance mutations with a new-generation mTOR inhibitor. *Nature*, 534(7606):272-6.
- 131, Kawata T, Tada K, Kobayashi M, Sakamoto T, Takiuchi Y, Iwai F, Sakurada M, Hishizawa M, Shirakawa K, Shindo K, Sato H, Takaori-Kondo A. (2018) Dual inhibition of the mTORC1 and mTORC2 signaling pathways is a promising therapeutic target for adult T-cell leukaemia. *Cancer Sci*, 109(1):103-111.
- 132, Vinayak S, Carlson RW. (2013) mTOR inhibitors in the treatment of breast cancer. *Oncology (Williston Park)*, 27(1):38-44, 46, 48 passim.
- 133, Esmaeili M, Hamans BC, Navis AC, van Horssen R, Bathen TF, Gribbestad IS, Leenders WP, Heerschap A. (2014) IDH1 R132H mutation generates a distinct phospholipid metabolite profile in glioma. *Cancer Res*, 74(17):4898-907.
- 134, Mihalik R, Uher F, Pocsik É É, Berezi L, Benczur M, Kopper L. (1996) Detection of Drug-induced Apoptosis by Flow Cytometry after Alkaline Extraction of Ethanol Fixed Cells. *Pathol Oncol Res*, 2(1-2):78-83.
- 135, Márk Á, Hajdu M, Váradi Z, Sticz TB, Nagy N, Csomor J, Berezi L, Varga V, Csóka M, Kopper L, Sebestyén A. (2013) Characteristic mTOR activity in Hodgkin-lymphomas offers a potential therapeutic target in high risk disease--a combined tissue microarray, in vitro and in vivo study. *BMC Cancer*, 13:250.
- 136, Krencz I, Sebestyén A, Fábrián K, Márk Á, Moldvay J, Khor A, Kopper L, Pápay J. (2017) Expression of mTORC1/2-related proteins in primary and brain metastatic lung adenocarcinoma. *Hum Pathol*, 62:66-73.
- 137, Szoboszlai N, Guo X, Ozohanics O, Oláh J, Gömöry Á, Mihucz VG, Jeney A, Vékey K. (2014) Determination of energy metabolites in cancer cells by porous graphitic carbon liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry for the assessment of energy metabolism. *Anal Chim Acta*, 819:108-15.
- 138, Jaitz L, Mueller B, Koellensperger G, Huber D, Oburger E, Puschenreiter M, Hann S. (2011) LC-MS analysis of low molecular weight organic acids derived from root exudation. *Anal Bioanal Chem*, 400(8):2587-96.

- 139, Koubaa M, Cocuron JC, Thomasset B, Alonso AP. (2013) Highlighting the tricarboxylic acid cycle: liquid and gas chromatography-mass spectrometry analyses of (13)C-labeled organic acids. *Anal Biochem*, 436(2):151-9.
- 140, Jády AG, Nagy ÁM, Kőhidi T, Ferenczi S, Tretter L, Madarász E. (2016) Differentiation Dependent Energy Production and Metabolite Utilization: A Comparative Study on Neural Stem Cells, Neurons, and Astrocytes. *Stem Cells Dev*, 25(13):995-1005.
- 141, Németh B, Doczi J, Csete D, Kacso G, Ravasz D, Adams D, Kiss G, Nagy AM, Horvath G, Tretter L, Mócsai A, Csépanyi-Kömi R, Iordanov I, Adam-Vizi V, Chinopoulos C. (2016) Abolition of mitochondrial substrate-level phosphorylation by itaconic acid produced by LPS-induced Irg1 expression in cells of murine macrophage lineage. *FASEB J*, 30(1):286-300.
- 142, Nagy AM, Fekete R, Horvath G, Koncsos G, Kriston C, Sebestyén A, Giricz Z, Kornyei Z, Madarász E, Tretter L. (2018) Versatility of microglial bioenergetic machinery under starving conditions. *Biochim Biophys Acta*, 1859(3):201-214.
- 143, Elhammali A, Ippolito JE, Collins L, Crowley J, Marasa J, Piwnicka-Worms D. (2014) A high-throughput fluorimetric assay for 2-hydroxyglutarate identifies Zaprinast as a glutaminase inhibitor. *Cancer Discov*, 4(7):828-39.
- 144, Sanchez-Arago M, Chamorro M, Cuezva JM. (2010) Selection of cancer cells with repressed mitochondria triggers colon cancer progression. *Carcinogenesis*, 31(4):567-576.
- 145, Gupta S. and Chawla K. (2013) Oncometabolomics in cancer research. *Expert Rev Proteomics*, 10(4):325-336.
- 146, Kubota M, Tsuda T, Minase T, Nakada K, Furudate M. (1994) Autoradiographic analysis of [14C]deoxy-D-glucose in thyroid cancer xenografts: a comparative study with pathologic correlation. *Ann Nucl Med*, 8(1):75-83.
- 147, Spratlin JL, Serkova NJ, Eckhardt SG. (2009) Clinical applications of metabolomics in oncology: a review. *Clin Cancer Res*, 15(2):431-440.
- 148, Isidoro A, Casado E, Redondo A, Acebo P, Espinosa E, Alonso AM, Cejas P, Hardisson, D, Fresno Vara JA, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M, Cuezva JM. (2005)

Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. *Carcinogenesis*, 26(12):2095-2104.

149, Abbassi-Ghadi N, Kumar S, Huang J, Goldin R, Takats Z, Hanna GB. (2013) Metabolomic profiling of oesophago-gastric cancer: a systematic review. *Eur J Cancer*, 49(17):3625-3637.

150, Cuezva JM, Krajewska M, de Heredia ML, Krajewski S, Santamaría G, Kim H, Zapata JM, Marusawa H, Chamorro M, Reed JC. (2002) The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res*, 62(22):6674-81.

151, Betz C, Stracka D, Prescianotto-Baschong C, Frieden M, Demaurex N, Hall MN. (2013) Feature Article: mTOR complex 2-Akt signaling at mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) regulates mitochondrial physiology. *Proc Natl Acad Sci. U S A*, 110(31):12526-12534.

152, Gao X, Locasale JW. (2016) Serine metabolism links tumor suppression to the epigenetic landscape. *Cell Metab*, 24(6):777-779.

153, Colvin H, Nishida N, Konno M, Haraguchi N, Takahashi H, Nishimura J, Hata T, Kawamoto K, Asai A, Tsunekuni K, Koseki J, Mizushima T, Satoh T, Doki Y, Mori M, Ishii H. (2016) Oncometabolite D-2-Hydroxyglurate Directly Induces Epithelial-Mesenchymal Transition and is Associated with Distant Metastasis in Colorectal Cancer. *Sci Rep*, 6:36289.

154, Kernytsky A, Wang F, Hansen E, Schalm S, Straley K, Gliser C, Yang H, Travins J, Murray S, Dorsch M, Agresta S, Schenkein DP, Biller SA, Su SM, Liu W, Yen KE. (2015) IDH2 mutation-induced histone and DNA hypermethylation is progressively reversed by small-molecule inhibition. *Blood*, 125(2):296-303.

155, Jin Y, Elalaf H, Watanabe M, Tamaki S, Hineno S, Matsunaga K, Woltjen K, Kobayashi Y, Nagata S, Ikeya M, Kato T Jr, Okamoto T, Matsuda S, Toguchida J. (2015) Mutant IDH1 Dysregulates the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Association with Gene-Specific Histone Modifications to Cartilage- and Bone-Related Genes. *PLoS One*, 10(7):e0131998.

- 156, M Gagné L, Boulay K, Topisirovic I, Huot MÉ, Mallette FA. (2017) Oncogenic Activities of IDH1/2 Mutations: From Epigenetics to Cellular Signaling. *Trends Cell Biol*, 27(10):738-752.
- 157, Li F, He X, Ye D, Lin Y, Yu H, Yao C, Huang L, Zhang J, Wang F, Xu S, Wu X, Liu L, Yang C, Shi J, He X, Liu J, Qu Y, Guo F, Zhao J, Xu W, Zhao S. (2015) NADP(+)-IDH Mutations Promote Hypersuccinylation that Impairs Mitochondria Respiration and Induces Apoptosis Resistance. *Mol Cell*, 60(4):661-75.
- 158, Kottakis F, Nicolay BN, Roumane A, Karnik R, Gu H, Nagle JM, Boukhali M, Hayward MC, Li YY, Chen T, Liesa M, Hammerman PS, Wong KK, Hayes DN, Shirihai OS, Dyson NJ, Haas W, Meissner A, Bardeesy N. (2016) LKB1 loss links serine metabolism to DNA methylation and tumorigenesis. *Nature*, 539(7629):390-395.
- 159, Marchiq I, Pouysségur J. (2016) Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate/H⁺ symporters. *J Mol Med (Berl)*, 94(2):155–171.
- 160, Li J, Kim SG, Blenis J. (2014) Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab*, 19(3):373-9.
- 161, Chen X, Zhu Y, Wang Z, Zhu H, Pan Q, Su S, Dong Y, Li L, Zhang H, Wu L, Lou X, Liu S. (2016) mTORC1 alters the expression of glycolytic genes by regulating KPNA2 abundances. *J Proteomics*, 136(16):13-24.
- 162, Fu X, Chin RM, Vergnes L, Hwang H, Deng G, Xing Y, Pai MY, Li S, Ta L, Fazlollahi F, Chen C, Prins RM, Teitell MA, Nathanson DA, Lai A, Faull KF, Jiang M, Clarke SG, Cloughesy TF, Graeber TG, Braas D, Christofk HR, Jung ME, Reue K, Huang J. (2015) 2-Hydroxyglutarate Inhibits ATP Synthase and mTOR Signaling. *Cell Metab*, 22(3):508-15.
- 163, Carbonneau M, M Gagné L, Lalonde ME, Germain MA, Motorina A, Guiot MC, Secco B, Vincent EE, Tumber A, Hulea L, Bergeman J, Oppermann U, Jones RG, Laplante M, Topisirovic I, Petrecca K, Huot MÉ, Mallette FA. (2016) The oncometabolite 2-hydroxyglutarate activates the mTOR signalling pathway. *Nat Commun*, 7:12700.
- 164, Tan P, Tiong IS, Fleming S, Pomilio G, Cummings N, Droogleever M, McManus J, Schwarzer A, Catalano J, Patil S, Avery S, Spencer A, Wei A. (2016) The mTOR

inhibitor everolimus in combination with azacitidine in patients with relapsed/refractory acute myeloid leukaemia: a phase Ib/II study. *Oncotarget*, 8(32):52269-52280.

165, Brenner AK, Andersson Tvedt TH, Bruserud Ø. (2016) The Complexity of Targeting PI3K-Akt-mTOR Signalling in Human Acute Myeloid Leukaemia: The Importance of Leukemic Cell Heterogeneity, Neighbouring Mesenchymal Stem Cells and Immunocompetent Cells. *Molecules*, 21(11) pii: E1512.

166, Miller JJ, Wen PY. (2016) Emerging targeted therapies for glioma. *Expert Opin Emerg Drugs*, 21(4):441-452.

167, Becher OJ, Gilheeney SW, Khakoo Y, Lyden DC, Haque S, De Braganca KC, Kolesar JM, Huse JT, Modak S, Wexler LH, Kramer K, Spasojevic I, Dunkel IJ. (2017) A phase I study of perifosine with temsirolimus for recurrent pediatric solid tumors. *Pediatr Blood Cancer*, 64(7): e26409.

168, Zhao X, Jiang P, Deng X, Li Z, Tian F, Guo F, Li X, Wang S. (2016) Inhibition of mTORC1 signaling sensitizes hepatocellular carcinoma cells to glycolytic stress. *Am J Cancer Res*, 6(10):2289-2298.

169, Chen L, Cui H, Fang J, Deng H, Kuang P, Guo H, Wang X, Zhao L. (2016) Glutamine deprivation plus BPTES alters etoposide- and cisplatin-induced apoptosis in triple negative breast cancer cells. *Oncotarget*, 7(34):54691-54701.

170, Mazor T, Chesnelong C, Pankov A, Jalbert LE, Hong C, Hayes J, Smirnov IV, Marshall R, Souza CF, Shen Y, Viswanath P, Noushmehr H, Ronen SM, Jones SJM, Marra MA, Cairncross JG, Perry A, Nelson SJ, Chang SM, Bollen AW, Molinaro AM, Bengtsson H, Olshen AB, Weiss S, Phillips JJ, Luchman HA, Costello JF. (2017) Clonal expansion and epigenetic reprogramming following deletion or amplification of mutant IDH1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(40):10743-10748.

171, Wong CC, Qian Y, Yu J. (2017) Interplay between epigenetics and metabolism in oncogenesis: mechanisms and therapeutic approaches. *Oncogene*, 36(24):3359-3374.

172, Navis AC, Niclou SP, Fack F, Stieber D, van Lith S, Verrijp K, Wright A, Stauber J, Tops B, Otte-Holler I, Wevers RA, van Rooij A, Pusch S, von Deimling A, Tigchelaar W, van Noorden CJ, Wesseling P, Leenders WP. (2013) Increased mitochondrial activity in a novel IDH1-R132H mutant human oligodendroglioma

xenograft model: in situ detection of 2-HG and α -KG. *Acta Neuropathol Commun*, 1:18.

173, Salamanca-Cardona L, Shah H, Poot AJ, Correa FM, Di Gialleonardo V, Lui H, Miloushev VZ, Granlund KL, Tee SS, Cross JR, Thompson CB, Keshari KR. (2017) In Vivo Imaging of Glutamine Metabolism to the Oncometabolite 2-Hydroxyglutarate in IDH1/2 Mutant Tumors. *Cell Metab*, 26(6):830-841.e3.

174, Khurshed M, Molenaar RJ, Lenting K, Leenders WP, van Noorden CJF. (2017) In silico gene expression analysis reveals glycolysis and acetate anaplerosis in IDH1 wild-type glioma and lactate and glutamate anaplerosis in IDH1-mutated glioma. *Oncotarget*, 8(30):49165-49177.

175, Fack F, Tardito S, Hochart G, Oudin A, Zheng L, Fritah S, Golebiewska A, Nazarov PV, Bernard A, Hau AC, Keunen O, Leenders W, Lund-Johansen M, Stauber J, Gottlieb E, Bjerkvig R, Niclou SP. (2017) Altered metabolic landscape in IDH-mutant gliomas affects phospholipid, energy, and oxidative stress pathways. *EMBO Mol Med*, 9(12):1681-1695.

176, Lee CY, Lai HY, Chiu A, Chan SH, Hsiao LP, Lee ST. (2016) The effects of antiepileptic drugs on the growth of glioblastoma cell lines. *J Neurooncol*, 127(3):445-53.

177, Killick-Cole CL, Singleton WGB, Bienemann AS, Asby DJ, Wyatt MJ, Boulter LJ, Barua NU, Gill SS. (2017) Repurposing the anti-epileptic drug sodium valproate as an adjuvant treatment for diffuse intrinsic pontine glioma. *PLoS One*, 12(5):e0176855.

178, Young SZ, Bordey A. (2009) GABA's control of stem and cancer cell proliferation in adult neural and peripheral niches. *Physiology (Bethesda)*, 24:171-85.

179, Nicholson-Guthrie CS, Guthrie GD, Sutton GP, Baenziger JC. (2001) Urine GABA levels in ovarian cancer patients: elevated GABA in malignancy. *Cancer Lett*, 162(1):27-30.

180, Takehara A, Hosokawa M, Eguchi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Nakamura Y, Nakagawa H. (2007) Gamma-aminobutyric acid (GABA) stimulates pancreatic cancer growth through overexpressing GABAA receptor pi subunit. *Cancer Res*, 67(20):9704-12.

- 181, Miao Y, Zhang Y, Wan H, Chen L, Wang F. (2010) GABA-receptor agonist, propofol inhibits invasion of colon carcinoma cells. *Biomed Pharmacother*, 64(9):583-8.
- 182, El-Habr EA, Dubois LG, Burel-Vandenbos F, Bogeas A, Lipecka J, Turchi L, Lejeune FX, Coehlo PL, Yamaki T, Wittmann BM, Fareh M, Mahfoudhi E, Janin M, Narayanan A, Morvan-Dubois G, Schmitt C, Verreault M, Oliver L, Sharif A, Pallud J, Devaux B, Puget S, Korkolopoulou P, Varlet P, Ottolenghi C, Plo I, Moura-Neto V, Virolle T, Chneiweiss H, Junier MP. (2017) A driver role for GABA metabolism in controlling stem and proliferative cell state through GHB production in glioma. *Acta Neuropathol*, 133(4):645-660.
- 183, Neman J, Termini J, Wilczynski S, Vaidehi N, Choy C, Kowolik CM, Li H, Hambrecht AC, Roberts E, Jandial R. (2014) Human breast cancer metastases to the brain display GABAergic properties in the neural niche. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(3):984-9.
- 184, Schnepf PM, Lee DD, Guldner IH, O'Tighearnaigh TK, Howe EN, Palakurthi B, Eckert KE, Toni TA, Ashfeld BL, Zhang S. (2017) GAD1 Upregulation Programs Aggressive Features of Cancer Cell Metabolism in the Brain Metastatic Microenvironment. *Cancer Res*, 77(11):2844-2856.
- 185, Lenting K, Khurshed M, Peeters TH, van den Heuvel CNAM, van Lith SAM, de Bitter T, Hendriks W, Span PN, Molenaar RJ, Botman D, Verrijp K, Heerschap A, Ter Laan M, Kusters B, van Ewijk A, Huynen MA, van Noorden CJF, Leenders WPJ. (2019) Isocitrate dehydrogenase 1-mutated human gliomas depend on lactate and glutamate to alleviate metabolic stress. *FASEB J*, 33(1):557-571.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények:

- 1.) **Hujber Z**, Jeney A, Oláh J, Szoboszlai N, Baranyai L, Környei J, Petővári G, Sebestyén A. (2015) Measuring ¹⁴C-glucose and ¹⁴C-acetate oxidation in tumour cells and tumorous host organism. *Magyar Onkol*, 59(4);292-301.

- 2.) Jeney A*, **Hujber Z***, Szoboszlai N, Fullár Sz, Oláh J, Pap É, Márk Á, Kriston C, Kralovánszky J, Kovalszky I, Vékey K, Sebestyén A. (2016) Characterisation of bioenergetic pathways and related regulators by multiple assays in human tumour cells. *Cancer Cell Int*, 16:4. (*megosztott első szerzős közlemény) **IF: 2,740**

- 3.) Sebestyén A, **Hujber Z**, Jeney A, Kopper L. (2016) Tumormetabolizmus – „metabolikus újraprogramozás” – anyagcsere szabályozás változásai és jelentősége daganatokban. *Klinikai Onkológia*, 3(1):51-58.

- 4.) **Hujber Z**, Petővári G, Szoboszlai N, Dankó T, Nagy N, Kriston C, Krencz I, Paku S, Ozohanics O, Drahos L, Jeney A, Sebestyén A. (2017) Rapamycin (mTORC1 inhibitor) reduces the production of lactate and 2- hydroxyglutarate oncometabolites in IDH1 mutant fibrosarcoma cells. *J Exp Clin Cancer Res*, 36(1):74. **IF: 6,217**

- 5.) **Hujber Z**, Horváth G, Petővári G, Krencz I, Dankó T, Mészáros K, Rajnai H, Szoboszlai N, Leenders WPJ, Jeney A, Tretter L, Sebestyén A. (2018) GABA, glutamine, glutamate oxidation and succinic semialdehyde dehydrogenase expression in human gliomas. *J Exp Clin Cancer Res*, 37(1):271. **IF: 6,217**

A disszertációtól független saját közlemények:

- 1.) Mikó E, Vida A, Kovács T, Ujlaki G, Trencsényi G, Márton J, Sári Z, Kovács P, Boratkó A, **Hujber Z**, Csonka T, Antal-Szalmás P, Watanabe M, Gombos I, Csoka B, Kiss B, Vigh L, Szabó J, Méhes G, Sebestyén A, Goedert JJ, Bai P. (2018) Lithocholic acid, a bacterial metabolite reduces breast cancer cell proliferation and aggressiveness. *Biochim Biophys Acta*, 1859(9):958-974. **IF: 4,280**

- 2.) Krencz I, Sebestyén A, Pápay J, Jeney A, **Hujber Z**, Burger CD, Keller CA, Khor A. (2018) In Situ Analysis of mTORC1/2 and Cellular Metabolism-Related Proteins in Human Lymphangioliomyomatosis. *Hum Pathol*, 79:199-207. **IF: 3,014**

- 3.) Sticz TB, Molnár A, Dankó T, **Hujber Z**, Petővári G, Nagy N, Végső G, Kopper L, Sebestyén A. (2018) The effects of different mTOR inhibitors in EGFR inhibitor resistant colon carcinoma cells. *Pathol Oncol Res*, doi: 10.1007/s12253-018-0434-4. [Epub ahead of print]. **IF: 1,935**

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Sebestyén Annának, aki Ph.D. hallgatói munkámban mindvégig támogatott, tanított és biztosította szakmai fejlődésemet. Tudományos tapasztalatai, kutatói szemlélete és gondolkodása nagy motivációt biztosított számomra kutatásaim során.

Köszönettel tartozom Dr. Jeney András professzor úrnak, hogy ötleteivel, tanácsaival támogatott. Tudományos Diákköri kutatásaim során a vele folytatott érdekes és motiváló szakmai beszélgetések alapján döntöttem el, hogy jelentkeztem a Doktori Iskola Onkológia programjába Ph.D. hallgatónak.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Matolcsy András professzor úrnak, hogy Ph.D. kutatásaimat az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben végezhettem.

Szeretném megköszönni Dr. Szoboszlai Norbertnek a kromatográfiai-tömegspektrometriai mérésekben nyújtott rengeteg segítségét és hogy Tudományos Diákköri hallgatóként mellettem állt, támogatott.

Köszönöm a Tumorbiológiai labor jelenlegi és volt munkatársainak a motiváló szakmai környezetet és a baráti légkör kialakítását: Dr. Hajdu Melinda, Dr. Nagy Noémi, Dr. Márk Ágnes, Dr. Krencz Ildikó, Dankó Titanilla, Tóth Fanni és Petővári Gábor.

Köszönetemet szeretném kifejezni Csorba Gézánnának a sejt- és szövettanyésztési technikák tanításáért.

Köszönöm Dankó Titanillának a rengeteg lektorálási és kísérletben nyújtott segítségét.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Krenács Tibornak, hogy dolgozatom házi bírálatát készségesen elvállalta.

Köszönet Saskői Évának a dolgozat lektorálásában való segítségéért.

Köszönöm Dr. Oláh Lászlónénak a szakmai segítségét, kísérletekben nyújtott támogatást.

Köszönöm Dr. Drahos Lászlónak és az MTA Tömegspektrometriai Osztályának az LC-MS mérési lehetőséget.

Köszönet illeti Dr. Barna Gábor és Tolnai-Kriston Csillát az áramlási citometriai mérésekben való közreműködésükért.

Köszönet Dr. Patócs Attilának és Dr. Mészáros Katalinnak az LC-MS műszer biztosításáért és szakmai tanácsaikért.

Köszönöm Dr. William P. Leendersnek, hogy rendelkezésünkre bocsájtotta az U251 MG glioma sejtvonalt párokat.

Köszönöm Dr. Tretter László professzor úrnak és Dr. Horváth Gergőnek a biokémiai vizsgálatokat.

Köszönettel tartozom Dr. Bödör Csabának, Dr. Király Péter Attilának és Dr. Gángó Ambrusnak a szekvenálási munkákért.

Köszönet Dr. Paku Sándornak az elektronmikroszkópos felvételekért.

Köszönöm Dr. Rajnai Hajnáknak a patológiai kiértékelésben nyújtott segítségét.

Köszönöm Sztodola Andrásnak az állatkísérletek kivitelezését.

Köszönöm az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet valamennyi munkatársának a sok segítséget és támogatást.

Hálás vagyok családom tagjainak, akik támogattak, hittek bennem és türelemmel kísérték eddigi munkámat, nélkülük nem tarthatnék itt.