

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2419.

PETŐVÁRI GÁBOR

Onkológia
című program

Programvezető: Dr. Kopper László, egyetemi tanár
Témavezető: Dr. Sebestyén Anna, tudományos főmunkatárs

mTOR komplex aktivitás és metabolikus változások mint potenciális célpontok szolid daganatokban

Doktori értekezés

Petővári Gábor

Semmelweis Egyetem
Patológiai tudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Borka Katalin, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Péterfia Bálint, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szalai Csaba, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tóth Erika, Ph.D., osztályvezető
Dr. Cervenák László, Ph.D., tudományos
főmunkatárs

Budapest
2020

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	1
Rövidítések jegyzéke	4
1 Bevezetés	11
1.1 A daganatok anyagcsere változásai a tumornövekedésben	11
1.1.1 A tumorsejtek anyagcsere-változásai	13
1.1.1.1 Fokozott glükózhasznosítás és a Warburg-effektus	13
1.1.1.2 A glutaminolízis szerepe a tumoranyagcserében	16
1.1.1.3 A citromsavciklus (Szentgyörgyi-Krebs ciklus) és az oxidatív foszforiláció aktivitásváltozásai tumorsejtekben.....	18
1.1.1.4 Fontosabb zsírsav anyagcsere-változások jelentősége daganatokban20	
1.1.2 Metabolikus heterogenitás és adaptációs mechanizmusok a daganatok növekedésében, progressziójában.....	21
1.1.3 Metabolikus támadáspontok, a daganatsejtek anyagcseréjét befolyásoló hatóanyagok és célpontjaik, bizonyos jól ismert szerek metabolikus off-target hatásai	23
1.2 mTOR jeátviteli útvonal szerepe a daganatok anyagcseréjében.....	27
1.2.1 Az mTOR kináz és komplexei: mTORC1 és mTORC2.....	28
1.2.2 Az mTOR komplexek aktivitásának változásai, daganatbiológiai jellegzetességei	30
1.2.3 Az mTOR jelátviteli útvonal szerepe sejtfunciók, elsősorban a metabolikus folyamatok szabályozásában.....	32
1.2.4 mTOR jelátviteli útvonal gátlók – klasszikus és új generációs inhibitorok	35
1.3 A vizsgálatainkban tanulmányozott daganattípusok legfontosabb jellemzői..	38
1.3.1 A gliomák daganatbiológiai jellemzői.....	38
1.3.1.1 A gliomák osztályozása, klinikai jelentősége, kezelése.....	38
1.3.2 A gliomák mTOR aktivitás és más anyagcsere változás jellemzői.....	41
1.4 Az emlődaganatok daganatbiológiai jellemzői.....	42
1.4.1 Az emlődaganatok osztályozása, jellegzetességei, kezelése	42
1.4.2 Az emlődaganatok és metabolikus jellemzői	48
1.4.2.1 Hormonreceptor pozitív emlődaganatok metabolikus változásai	49
1.4.2.2 HER2+ és tripla negatív emlődaganatok metabolikus változásai	50
1.4.2.3 Metabolikus gátlók az emlődaganatok kezelésében.....	50

2	Célkitűzések	52
3	Módszerek	53
3.1	In vitro, in vivo modellek	53
3.1.1	Sejt- és szövettanyésztés, <i>in vitro</i> vizsgálatok.....	53
3.1.2	<i>In vitro</i> kezelések.....	53
3.1.3	Proliferációs vizsgálatok <i>in vitro</i>	54
3.1.4	Xenograft modell létrehozása ZR75.1 humán emlő carcinoma sejtekkel – <i>in vivo</i> vizsgálatok	55
3.2	Fehérjeszintű expressziós vizsgálatok	55
3.2.1	Humán gliomás és emlő carcinomás biopsziás minták vizsgálata, szöveti multi blokk készítése	55
3.2.2	Immunhisztokémiai (IHC) festések humán tumorszövet mintákon	56
3.2.3	Western blot és WES Simple vizsgálatok	57
3.3	Metabolitok extrakciója és mennyiségi meghatározása tömegspektrometriával 59	
3.4	Metabolikus, illetve mTOR komplex fehérjék génexpressziójának és emlődaganatos betegek klinikai adatainak elemzése a KM-plotter adatbázis felhasználásával.....	59
3.5	Statisztikai analízis	60
4	Eredmények	61
4.1	Humán gliomák vizsgálatával kapcsolatos eredmények.....	61
4.1.1	mTOR jelátviteli útvonal aktivitásával összefüggő fehérjék és metabolikus enzimek expresszió vizsgálata humán gliomákban	61
4.1.2	mTOR aktivitással összefüggő metabolikus különbségek és temozolomide, valamint mTOR inhibitorok hatásának vizsgálata <i>in vitro</i> humán glioma sejtvonalakban	64
4.1.3	Metabolikus aktivitással összefüggő fehérje expresszió és metabolit különbségek, valamint metabolikus gátlószerek hatása glioma sejtvonalakban	66
4.1.4	Kombinációs kezelések hatása glioma sejtvonalakban	71
4.2	Emlő daganatok vizsgálatával kapcsolatos eredmények	74
4.2.1	mTOR és metabolikus gátlószerek hatásainak összefüggése a fehérjeexpresszióval emlődaganat sejtvonalakban.....	74
4.2.2	A kiválasztott mTOR és metabolikus fehérje expresszió különbségek vizsgálata humán emlődaganatokban <i>in situ</i>	79
4.2.3	<i>In situ</i> mTOR és metabolikus fehérje expressziós különbségek prognosztikai jelentőségének vizsgálata.....	83
4.2.4	Az mTOR gátló kezelések hatásának vizsgálata doxorubicinnel és doxycyclinnel kombinációban <i>in vitro</i> és <i>in vivo</i>	89
5	Megbeszélés.....	91

5.1	Humán glioma szövetek és sejtvonalak mTOR aktivitása és metabolikus jellegzetességei, mint lehetséges terápiás célpontok	91
5.2	Humán emlődaganatok mTOR és metabolikus aktivitás jellemzése és ennek jelentősége	96
6	Következtetések.....	102
7	Összefoglalás	104
8	Summary.....	105
9	Irodalomjegyzék	106
10	Saját publikációk jegyzéke	144
11	Köszönetnyilvánítás	146

Rövidítések jegyzéke

2DG	2-deoxi-glükóz
2-HG	2-hidroxioglutarát
3BP	3-brómpiruvát
4E-BP	4E kötő fehérje (4E-BP1: 1-es típus)
AB	Alamar Blue
ACC	acetyl-koenzim A-karboxiláz
ACLY	ATP-citrát-liáz
ACSS2	acetyl-koenzim A-szintetáz 2
α -KG	α -ketoglutarát
α -KGDH	α -ketoglutarát-dehidrogenáz
AKT	v-akt egér thymoma virális onkogén homológ; szerin/treonin kináz
ALDH	aldehid-dehidrogenáz
ALL	akut lymphoid leukaemia
AML	akut myeloid leukaemia
AMPK	adenozin-monofoszfát-aktiválta kináz
AMPK β	adenozin-monofoszfát-aktiválta kináz b
ATCC	„American Type Culture Collection”
ATG13	„autophagy-related protein 13”
ATM	„ataxia telangiectasia-mutated protein kinase”
ATP	adenozin-trifoszfát
ATRX	X-kromoszómához kapcsolt alfa-talasszémia/mentális retardáció
BEZ	NVP-BEZ235 (PI3K és mTOR dual inhibitor)
BMS	BMS-303141 (ATP citrát-liáz inhibitor)
BPTES	bisz-2-(5-fenilacetamido-1,3,4-tiadiazol-2-il) etil szulfid
BRCA1/2	„breast cancer gene 1/2”
CAD	karbamil-foszfó-transzferáz
CB-839	2-(piridin-2-il)-N-(5-(4-(6-(2-(3-(trifluorometoxi) fenil) acetamid) piridazin-3-il) butil)-1, 3, 4-tiadiazol-2-il)-acetamid
CD36	„cluster of differentiation 36, platelet glycoprotein 4, fatty acid translocase (FAT)”

CD44	„cluster of differentiation 44”
CDK4/6	ciklin-dependens kináz 4/6
Chl	chloroquine (autofágia inhibitor)
CI	kombinációs index
c-Met	receptor tirozin kináz protoonkogén
c-Myc	celluláris myelocytomatosos onkogén
COXIV	„Cytochrome C Oxidase Subunit IV Isoform”
CPT1A	karnitin-palmitoil-transzferáz 1 A
CXC	kemokin
CS	citrát szintáz
DAB	3,3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorid
DCA	diklór-acetát
DCIS	ductalis <i>in situ</i> carcinoma
DEPTOR	„DEP domain containing mTOR-interacting protein”
DMFS	távoli metasztázis mentes túlélés
DMSO	dimetil-szulfoxid
DNS	dezoxiribonukleinsav
Doxo	doxorubicin
Doxy	doxycycline
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor
eIF4E	eukarióta iniciációs faktor 4 E
EMT	epithelialis-mesenchymalis tranzíció
ER	ösztrogén receptor
ERK	extracelluláris szignál-regulált kináz
ETC	elektron transzportlánc
Etom	etomoxir (CPT1A inhibitor)
FADH2	redukált flavin-adenin-dinukleotid
FAS	zsírsav-szintáz
FAT	FRAP, ATM, TRRAP mTOR domén
FATC	C-terminuson elhelyezkedő FAT domén
FBS	fötális borjúsavó
FBXW7	F-box/WD ismétlődéseket tartalmazó protein 7

FDA	„Food and Drug Administration”
FGF	fibroblaszt növekedési faktor
FGFR	fibroblaszt növekedési faktor receptor
FKBP12	12 kDa-os FK506-ot kötő fehérje
FOXO1/3a	„Forkhead Box O1/3a”
FRAP	FKBP12-rapamycin-asszociált fehérje
FRB	FKBP12-rapamycin kötő domén
FUM	fumarát
GAB	glutamináz B
GABA	gamma-amino-vaajsav
GAC	glutamináz C
GAM	glutamináz M
GAPDH	glicerín-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GATOR1	„GAP activity toward Rags 1”
GATOR2	„GAP activity toward Rags 2”
GDC	GDC-0068 (pan-Akt inhibitor)
GLS	glutamináz
GLU	glutamát
GLUT	glükóz transzporter (GLUT1: 1-es típus)
GnRH	„gonadotropin-releasing hormon”
GS	glutation-szintáz
GSH	glutation tripeptid
GSK3b	glikogén-szintáz-kináz 3 b
H3	hiszton 3
HEAT	Huntington, elongációs faktor 3, PR65/A
HER2	humán epidermális növekedési faktor receptor 2
HIF-1	hipoxia indukálta faktor 1 α transzkripció faktor
HK2	hexokináz 2
HOPS	„homotypic fusion and vacuole protein sorting complex”
HR	hormon receptor
IDH	izocitrát-dehidrogenáz (IDH1: 1-es típus)
IGF-1	inzulinszerű növekedési faktor-1

IGF1R	inzulinszerű növekedési faktor-1 receptor
IHC	immunhisztokémia
IL8	interleukin 8
IRS	insulin receptor szubsztrát
IRS-1	insulin receptor szubsztrát 1
KD	kináz domén
KGA	vese-típusú glutamináz
LAC	laktát
LC3	„(microtubule-associated protein 1A/1B-)light chain 3”
LCIS	lobularis <i>in situ</i> carcinoma
LC-MS	folyadék kromatográfia-tömegspektrometria
LDHA	laktát-dehidrogenáz A
LDHB	laktát-dehidrogenáz B
L-DON	6-diazo-5-oxo-L-norleucine
LGA	máj-típusú glutamináz
LumA	luminális A szubtypusú emlő carcinoma
LumB	luminális B szubtypusú emlő carcinoma
MAL	malát
MCT	monokarboxilát transzporter (MCT1: 1-es típus)
MDH	malát dehidrogenáz
MET	mesenchymális-epitheliális tranzíció
mIDH	izocitrát-dehidrogenáz mutáció
mLST8	„mammalian lethal with SEC13 protein 8”
MRM	többszörös reakciófigyelő módszer
mRNS	hírvivő RNS
mSIN1	„mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1”
MTHFD2	metil-tetrahidro-folát-reduktáz
mTOR	„mammalian target of rapamycin”
mTORC1	mTOR komplex 1
mTORC2	mTOR komplex 2
mTORI	mTOR inhibitor
MYC	MYC proto-onkogén

MYCL	MYCL proto-onkogén
MYCN	MYCN proto-onkogén
NADH	redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADK	NAD kináz
NADPH	redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NOS	másképp nem csoportosítható
OS	teljes túlélés
OXPHOS	oxidatív foszforiláció
PARP	poli-(ADP-ribóz)-polimeráz
PDGF	vérlemezke-eredetű növekedési faktor
PDK1	foszfatidil-inozitol dependens kináz-1
PD-L1	programozott sejthalál ligand-1
PET-CT	pozitron emissziós tomográfia-computer tomográfia
PFK2	foszfofruktokináz-2
PFKP	foszfofruktokináz P
PHD	prolil hidroxiláz
PI3K	foszfatidil-inozitol-3-kináz
PIP3	foszfatidil-inozitol-3,4,5-trifoszfát
PKC α	protein kináz C a
PKM2	piruvát-kináz M2 izoforma
PP	PP242 (mTORC1 és mTORC2 inhibitor)
PPAR γ	„peroxisome proliferator-activated receptor γ ”
PR	progeszteron receptor
PRAS40	„proline-rich Akt substrate of 40 kDa”
PROTOR1/2	„protein observed with rictor 1 and 2”
PTEN	„tensin homolog deleted on chromosome 10”
PYR	piruvát
R132H	IDH missszensz funkciónyeréses mutáció
Rab7	„Ras-related protein 7”
Rac1	„Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1”
Rag	„Ras-related GTP binding protein”
Rap1	„Ras-associated protein 1”

Rapa	rapamycin (mTORC1 inhibitor)
RAPTOR	„regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin”
RAS	„rat sarcoma viral oncogene homolog”
RB	„retinoblastoma”
REDD1	„regulated in development and DNA damage responses 1”
Rheb	„Ras homolog enriched in brain”
RICTOR	„rapamycin-insensitive companion of mTOR”
RNS	ribonukleinsav
ROS	reaktív oxigén gyök
RRM2	ribonukleotid reduktáz M2
RSK	riboszómális S6 kináz
S6	riboszómális S6 fehérje
S6K1	riboszómális S6 kináz 1
SAM	S-adenozilmetionin
SAMTOR	„S-adenosyl-L-methionine-binding protein of mammalian target of rapamycin”
SCD1	sztearol koenzimA deszaturáz-1
SCID	súlyos kombinált immunhiány
SCS	szukcinát-szintáz
SGK1	szérum-, glükokortikoid indukált proteon kináz-1
SKAR	„S6K1 Aly/REF-like target”
SLC1A5	„Solute Carrier Family 1 Member 5”
SLC7A5	„Solute Carrier Family 7 Member 5”
SRB	szulforodamin B
SREBP	„sterol regulatory element-binding protein 1”
SUC	szukcinát
TCA	citromsavciklus
TGF α	transzformáló növekedési faktor α
TMA	szöveti multi blokk
TMZ	temozolomide
TN	tripla negatív (emlő carcinoma)
TNF α	tumor nekrozis faktor α

TP53	tumor protein 53
TRRAP	„transformation/transcription domain-associated protein”
TSC1/2	„tuberous sclerosis proteins 1/2”
ULK1	„uncoordinated 51-like kinase 1”
UVRAG	„UV radiation resistance-associated gene”
VEGF	vaszkuláris növekedési faktor
VEGFR2	vaszkuláris növekedési faktor receptor 2
Wnt	„wingless-related integration site”
WZB117	„3-Fluoro-1,2-phenylene bis(3-hydroxybenzoate)”

1 Bevezetés

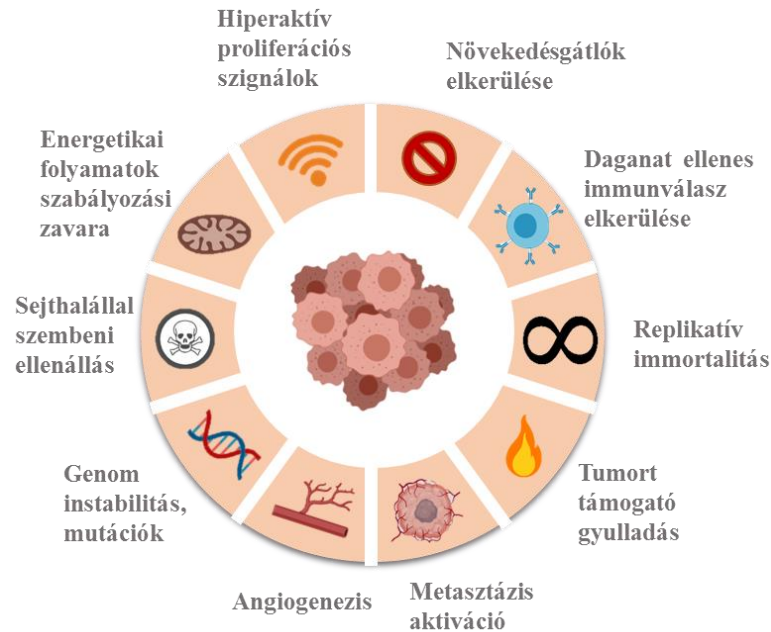
A sejtek anyagcsere (metabolikus) folyamatainak szabályozása fontos szerepet játszik a biológiai változások bioenergetikai hátterének biztosításában. A legkülönbözőbb betegségek, így a daganatbiológiai folyamatok megértéséhez is hozzájárulhat, adott kórképek metabolikus aktivitás-változásainak feltérképezése (1). Az elmúlt fél évszázadban az onko- és szupresszor génmutációk szerepének vizsgálata – a technikai fejlődések, köztük a humán genom projekt eredményeként is – óriási lendületet és hangsúlyt kapott. Párhuzamosan a célzott kezelések térnyerésével egyre szélesebb körben kutatott a terápiával szembeni rezisztenciamechanizmusok megértése, amiben a mikrokörnyezet, a tumorheterogenitás genetikai jellegzetességeinek vizsgálata mellett, a daganatok metabolikus útvonal változásainak megismerése is szükséges.

1.1 A daganatok anyagcsere változásai a tumornövekedésben

A görög *metabole* szó eredetileg változást jelent. A mai orvosbiológiai értelmezés szerint a metabolizmus – anyagcsere – olyan komplex reakciók, illetve folyamatok összessége, amelyek egyensúlyt teremtenek a felépítő (anabolikus) és lebontó (katabolikus) folyamatok között, miközben biztosítják az energiát és építőelemeket a sejtek, a szervezet növekedéséhez és fenntartásához. A lebontó folyamatok az oxigén jelenléte, felhasználása szempontjából is megkülönböztethetők. Eukarióta sejtekben a citrátciklus és oxidatív foszforiláció (OXPHOS) a mitokondriumban zajlik, de számos egyéb folyamat (pl. glikolízis, fehérje-, lipidbontás stb.) is segíti a bioenergetikai egyensúly fenntartásához a szükséges ATP és/vagy felépítőelemek biztosítását. Eközben egyéb kofaktorok és szubsztrátok (pl. NADH, NADPH, acetil- és metilcsoport) is termelődnek, ezek az előbbieket mellett epigenetikai módosításokhoz, a génszabályozás változásaihoz is szükségesek. A tumorsejteknek ATP és bioszintetikus prekursor molekula igényük mellett, a megemelkedett reaktív oxigén gyök (ROS) képződést is kompenzálni kell, ez a tumorsejtek túlélésében szintén rendkívül fontos (2).

A tumorsejtek jellegzetességei között a kontrollt vesztett növekedéssel összefüggésben egyre több tényezőt ismertünk meg. Hanahan és Weinberg legutóbb 2011-ben egészítette ki ezeket a jellegzetességeket többek között a daganatsejtek

megváltozott bioenergetikai sajátosságaival (1. ábra) (3, 4). Eredetük, genetikai és szövettani heterogenitásuk ellenére a tumorerő általánosan hasonló anyagcsereútvonal-átrendeződésekkel rendelkeznek. Ugyanakkor, az alapvető metabolikus folyamatok aktivitásának aránya még egy tumorban – az adott tumorszövet különböző területein is – különböző lehet (sejt mikrokönyezete, tápanyag-, növekedési faktor-, oxigénellátottságtól függően) (5).



1. ábra. A Hanahan és Weinberg által meghatározott legfontosabb tumorsejt jellegzetességek. 2011-ben a korábban megadott jellegzetességek (korlátlan osztódás, apoptózis gátlása, sejtnövekedést gátló hatások kikerülése, proliferáció fenntartása, angiogenesis fokozása, inváziós és áttétképző képesség) mellé négy további is került, ezek: tumorelles immunválasz elkerülése, tumort támogató gyulladások, genom instabilitás és mutációk, energetikai folyamatok átprogramozása). ((3) alapján)

A glükózhasznosítás útvonalai biokémiai tanulmányainkból is jól ismertek, a citoplazmában zajló glikolízis lépései után a legjobb hatékonysággal a mitokondriumban, a citromsavcikluson (TCA) és OXPHOS-on keresztül nyer energiát a sejt. Oxigén hiányában vagy akár pszeudohipoxia (daganatok szabályozási zavarai miatt oxigén jelenlétében is) esetén a glikolízis laktáttermelés mellett is képes energiát biztosítani (6). Energetikailag kedvezőbb a TCA-OXPHOS útvonal (36 mol ATP), mint a tejsavas glikolízis (2 mol ATP) (6), azonban utóbbi százszor gyorsabban zajlik le (7). Így adott

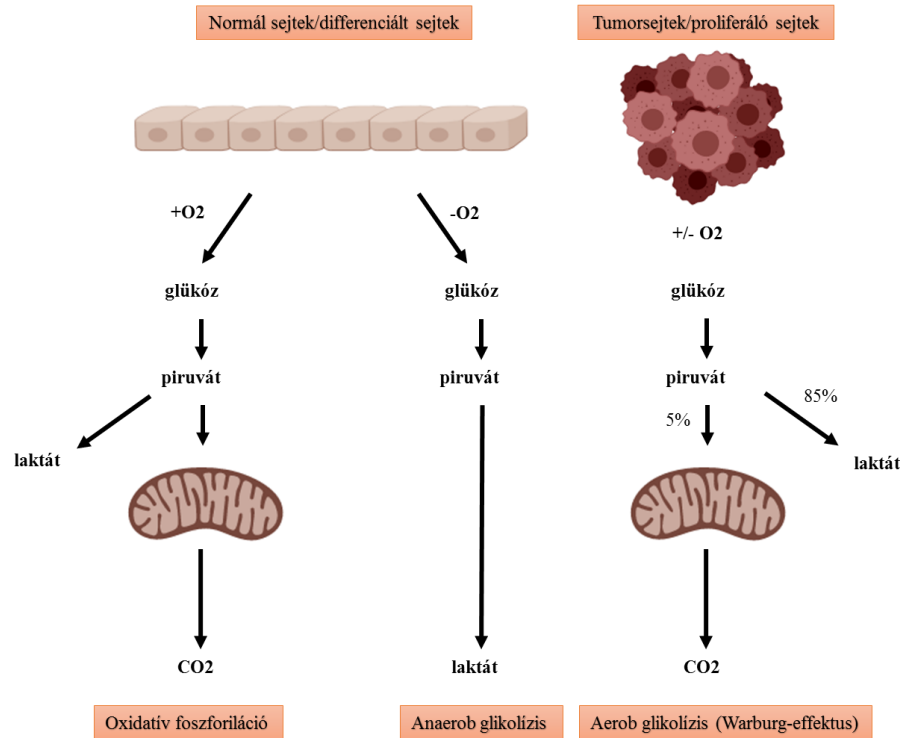
helyzetben ez a kedvezőtlenebb hatásfokú folyamat akár növekedési/alkalmazkodási előnyt is jelenthet a sejteknek. A mikrokörnyezetnek és a sejt aktuális állapotának (8) (pl. tápanyag-, vagy oxigénellátottság) is meghatározó szerepe van abban, hogy a sejtek glikolitikus vagy inkább OXPHOS fenotípusúak (9) az adott szövetben. Változó körülmények mellett a metabolikus heterogenitás (változatosság), a különböző sejtek metabolikus kapcsoltsága, szimbiózisa (adott területek a tumoron belül optimalizálva hasznosítják a rendelkezésre álló bioenergetikai forrásokat; pl. egyik régióban termelődő laktát egy oxigenizált részén a tumornak hasznosulhat) nagymértékben segíti a tumorszövet növekedését, a sejtek túlélését. Jól ismert, hogy a sejt stressz hatások (pl. növekedési faktorok hiánya vagy útvonalak gátlása) mellett kompenzál, így biztosítja túlélését, proliferációját. Előbbi saját elemek lebontását (autofágia) vagy mitokondriális károsodáskor, akár magas glikolitikus aktivitást is jelenthet (10). A daganat növekedéskor azonban a felépítő folyamatoknak jut fő szerep, osztódáskor az utódsejteknek szükségük van új nukleinsavak, fehérjék, membránok, sejtalkotók felépítésére. A glikolízis, a mitokondriális anyagcsere-folyamatok, a csonka citrátkör (ld. később) fontos helyet foglalnak el a tumorsejteket felépítő folyamatokban. A különböző anyagcsere köztes termékek (metabolitok), mint az acetyl-CoA vagy glükóz, aminosavak bontásából származó egyéb termékek nemcsak a zsírsav-, lipid-, fehérjeszintézisben, de a fehérje, hiszton acetylációjában vagy DNS metilációjában is részt vehetnek (11).

1.1.1 A tumorsejtek anyagcsere-változásai

1.1.1.1 Fokozott glükózhasznosítás és a Warburg-effektus

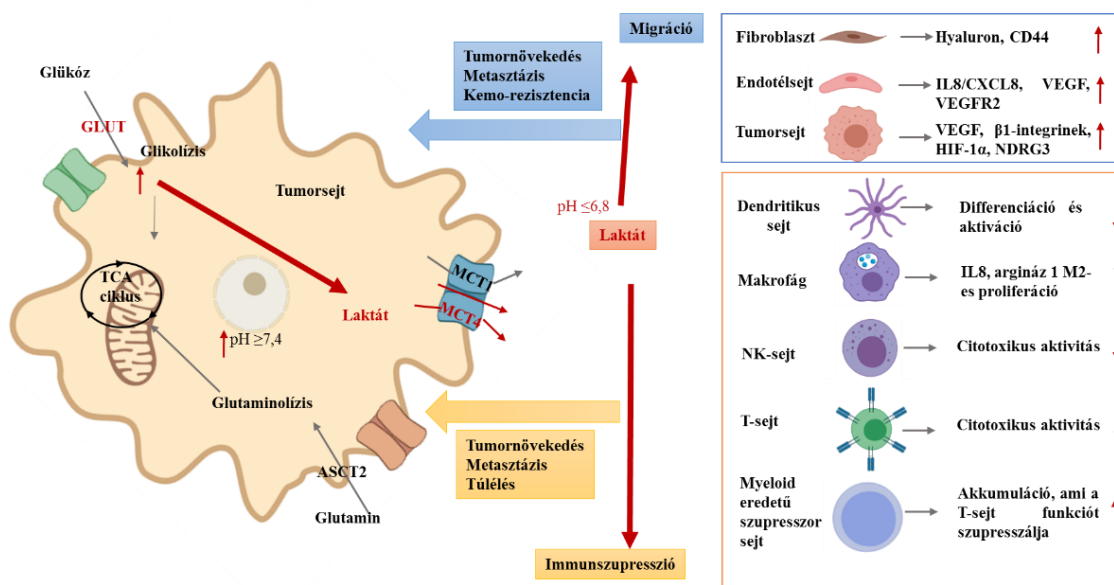
Az 1920-as években Otto Warburg figyelte meg és írta le elsőként, hogy a normál sejtekhez képest tumor sejtek sokkal több glükózt használnak. Daganatos és ép májszövet összehasonlító vizsgálatakor a daganatos szövet tízszer intenzívebb glükóz anyagcserét mutatott alacsonyabb oxigén felvétel és fokozott tejsav (laktát) termelés mellett (12, 13). Warburg a tumorok életképességének glükózfüggését is jellemezte (12). A folyamatot, a tejsavas glikolízist leírója után nevezzük Warburg-effektusnak, lényege, hogy a rendelkezésre álló oxigén mennyiségétől függetlenül a tumorsejtek többsége a piruvátot energiatermelés mellett egy gyors lépésben tejsavvá alakítja (2. ábra) (14). Ilyenkor 1 mol

glükózból az intracelluláris tejsav szint emelkedéssel párhuzamosan lényegesen kevesebb ATP keletkezik, gyorsasága miatt azonban a tumorsejtek előnyben részesíthetik (egységnyi idő alatt több ATP előállítás). A keletkező tejsavat a monokarboxilát transzporterek (MCT) szállítják az extracelluláris térbe, ahol mikrokörnyezeti hatásai is hozzájárulnak a tumornövekedéshez (9).



2. ábra. Warburg-effektus bioenergetikai következménye. A glükóz hasznosítás lehetséges eltérései jól oxigenizált, anaerob környezetben, illetve intenzíven osztódó sejtekben, köztük tumorsejtekben. ((6) alapján)

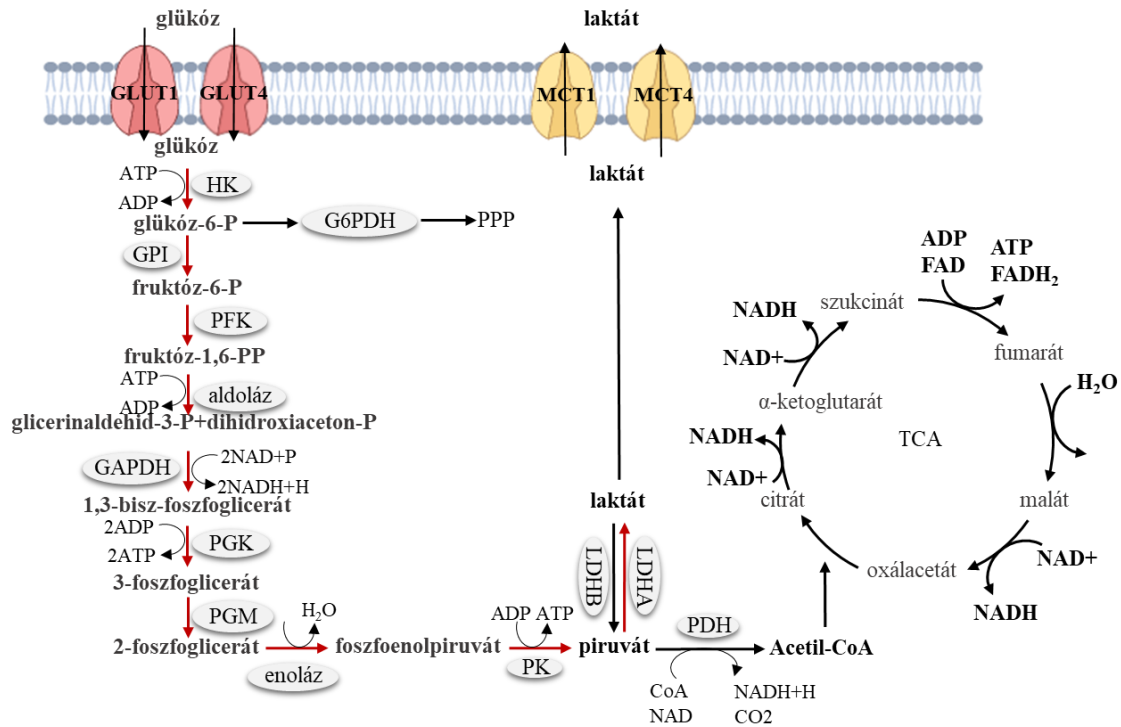
A savas mikrokörnyezet segíti a mátrix metalloproteázok aktiválódását és különböző szöveti elemek lebontását. Fokozza a fibroblaszt sejtek VEGF termelését, az endotél sejtek VEGFR2 expresszióját, ezen keresztül segíti a tumorban zajló angiogenezist. Laktát hatására bizonyos kemokinek és citokinek (pl. IL8, CXC-k és receptoraik) fokozott termelése, illetve a savas mikrokörnyezet gátolja a citotoxikus T-, illetve NK-sejtek differenciációját és funkcióját, míg az immunszuppresszív hatású regulátor T-sejtek és M2 típusú makrofágok differenciációját serkenti. Mindezek a tumormátrixban olyan szöveti és sejtes átrendeződéseknek kedveznek, amelyek nemcsak a tumornövekedést, de az invazív tumorsejtek megjelenését és keringésbe lépését, végsősorban a rezisztens sejtklónok túlélését, metasztázisok kialakulását segítik (3. ábra) (15).



3. ábra. A tejsavtermelés, az extracelluláris pH emelkedés tumornövekedést segítő hatásai. A tejsavas acidózis mikrokörnyezeti hatásai a szöveti környezetben a mátrixelemek lebontásával, a különböző sejtek gyulladásszerű és érképzést befolyásoló faktorainak termelődésével, segítik az immunuszuppresszív környezet kialakulását, a daganatnövekedést és az inváziót is. ((15) alapján)

A tumorsejtek glükóz-felvételét, így pl. a glükóz transzporterek (GLUT) kifejeződését, számos génregulációs változás, köztük többféle onkogén aktiváció is támogatja. A glikolízissel összefüggésben pl. a MYC, RAS, AMPK, HIF-1, PI3K, AKT, TP53 gének hiperaktivitását figyelték meg (13, 14, 16, 17). A GLUT családnak 13 tagja közül a GLUT1, a GLUT3, a GLUT4 és a GLUT6 fokozott termelését mutatták ki daganatsejtekben (18). Tumoros sejtekben tápanyagmegvonáskor fokozódik a GLUT1 kifejeződése és akár apoptózis rezisztencia is kialakulhat, míg erre a normál sejtek nem képesek, így elpusztulnak (18). A GLUT1 expresszió, ill. glükózfelvétel fokozódást a képalkotó diagnosztikában a tumornövekedés, illetve a metasztázisok monitorozására használja a 18-as fluor izotóppal jelölt dezoxiglükóz felvételét jelző FDG-PET-CT. A glükózfelvételt követően enzimek sora vesz részt a bioenergetikai hasznosításban, ezek mind potenciális célpontjai terápiás gátlók fejlesztésének (4. ábra). A glükóz foszforilációban szerepet játszó hexokináz-2 (HK2) és számos más glikolitikus enzim (PKM2, PFK2, LDHA) is emelkedett expressziót mutat a gyorsan proliferáló tumorokban (19, 20). A glikolízis és a Warburg-effektus szabályozását jelenleg egyre jobban ismerjük

(13, 16, 17, 21), mára a glikolízis gátlószer fejlesztések és a dietetikus/életmódváltozások is kitüntetett figyelmet kaptak a legkülönbözőbb terápiás vizsgálatokban (22).



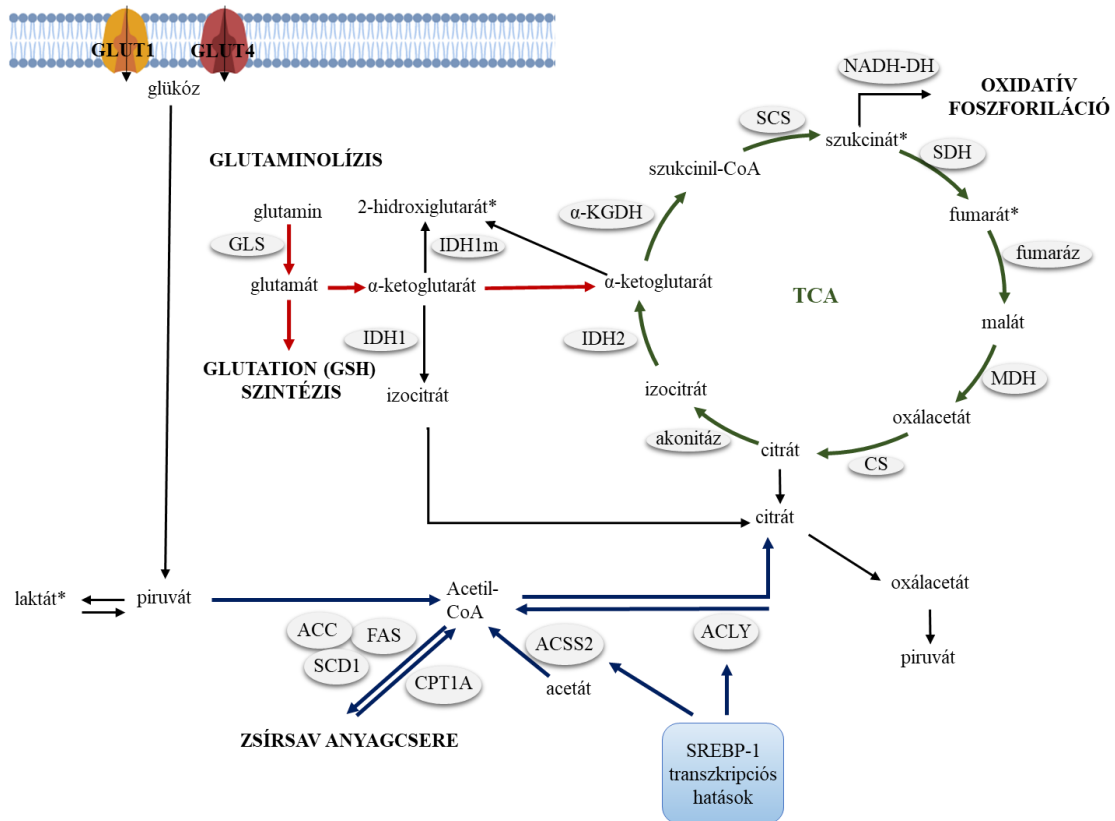
4. ábra. A glikolízis, a Warburg-effektus legfontosabb lépései és helyük a tumorsejtek bioenergetikai egyensúlyát fenntartó metabolikus folyamatokban. A glikolízis és a Warburg-effektus lépései piros nyíllal vannak kiemelve a feltüntetett vázlatos és leegyszerűsített metabolikus hálózatban (a részletesebb magyarázat a szövegben található).

1.1.1.2 A glutaminolízis szerepe a tumoranyagcserében

A glutamin a legnagyobb mennyiségben előforduló nem esszenciális aminosav a vérplazmában. Mennyisége a szövetekben jelentősen csökkenhet és így akár esszenciálissá is válhat gyors növekedés vagy bizonyos betegségek esetében. A proliferáló sejtek fokozott glutaminigénye közismert. A glutamin szerepe az anyagcsere-folyamatokban kettős, a fehérje- és nukleotidszintézisnek, az N- és O-glikolizációnak is fontos eleme, de a lebontásakor keletkező termékek bioenergetikai (glutamát) és transzamináz szubsztrátok is lehetnek (23).

A glutamin felvételéhez megfelelő transzporterekre (pl. SLC1A5, SLC7A5), majd lebontásához glutamináz (GLS) enzimre van szükség. A glutamin-glutamát átalakulást vese-típusú (GLS) vagy máj-típusú (GLS2) glutamináz enzimek segítik, ezek kinetikai tulajdonságainkban, és fehérjeszerkezetükben, szöveti eloszlásukban is különböznek egymástól (24). A GLS génről három (KGA – kidney glutaminase, GAC – glutaminase C, GAM – glutaminase M), míg a GLS2-ről két különböző izoforma (LGA – liver glutaminase, GAB – glutaminase B) keletkezhet. Ezek közül a GAM nem rendelkezik katalitikus aktivitással, míg általában a GAC fehérje nagy mennyisége jellemzi a tumorsejteket (24, 25). A tumornövekedésben a GLS-nek és a GLS2-nek ellenkező szerepe van. Míg a c-Myc transzkripció faktor szabályozása alatt álló GLS expressziója a tumornövekedéssel és agresszivitással, addig a P53 szabályozott GLS2 a tumornövekedés gátlásával függ össze (24-26). A GLS aktivitás fokozódását leírták már rossz prognózisú melanoma, agy-, máj- és tüdőtumorkban (25, 27, 28). A GLS2 fehérje túltermelésének szerepét megfigyelték a Rac1, illetve a PI3K/Akt útvonal gátlásában, ami összefüggést mutatott a betegek hosszabb túlélésével és az adott daganat migrációs, inváziós és áttétképző képességének csökkenésével is (27, 29).

A glutamát, fehérje- vagy nukleinsav beépülést követő lebontás után vagy direkt módon α -ketoglutarát (α -KG) átalakulást követően hasznosulhat. Az α -KG legalább kétirányú hasznosulása lehetséges: a) a citrátkörön át a mitokondriális oxidációban hozzájárulhat a normál sejtek (pl. lymphocyták, fibroblasztok, bélhámsejtek), daganatsejtek ATP termeléséhez (30), b) vagy reverz úton izocitrát-citrát átalakuláson keresztül támogatja a zsírsav-, lipidszintézist (5. ábra). A tumorsejtek megnövekvő energiaszükségletének és felépítő folyamatainak biztosítása egyes esetekben (főleg *in vitro*) glutamin-függőség kialakulásához is vezet (21, 31, 32). Jelentős, a daganatsejtek esetében is sokszor nélkülözhetetlen szerepe van az endogén antioxidáns hatású glutamát tartalmú glutathione tripeptidnek (GSH) is, ami a sejteket az oxidatív stresszhatásokkal szemben védi (30, 33). Természetesen a sejt redox egyensúlyának fenntartásában a GSH mellett a NADPH szint is kulcsfontosságú (30, 33). Mindezeket figyelembe véve, a glutaminolízis daganatterápiás célpont lehet, az elmúlt évtizedben a GLS inhibitorok tesztelése több fáziskísérlésben is megjelent (34).



5. ábra. A glutaminolízis, a glutaminhasználás, a TCA ciklus és a lipidanyagcsere legfontosabb lépései és helyük a tumorsejtek bioenergetikai egyensúlyát fenntartó metabolikus folyamatokban. A glutaminolízis lépései és a glutamátfelhasználás egyes lehetőségei, a TCA ciklus folyamatai és kapcsolata az OXPHOS-szal, a lipidanyagcsere a dolgozatban is vizsgált folyamatai és leegyszerűsített helye a vázlatos metabolikus hálózatban (a részletesebb magyarázat a szövegben található, a korábban nem szereplő rövidítések: α -KGDH – α -KG dehidrogenáz, SCS –szukcinát szintáz, MDH – malát dehidrogenáz, CS – citrát szintáz, ACLY – ATP-citrát liáz, ACSS2 – Acetil-koenzimA szintetáz 2, SCD1 – sztearol koenzimA deszaturáz 1), *onkometabolit.

1.1.1.3 A citromsavciklus (Szentgyörgyi-Krebs ciklus) és az oxidatív foszforiláció aktivitásváltozásai tumorsejtekben

A tumorszövetekben bioenergetikai szükségletek kiszolgálása sok esetben a sejtek anyagcsere-útvonalainak gyors átrendeződését igényli. Warburg eredeti hipotézise szerint a fokozott glikolízis mitokondriális diszfunkcióval magyarázható, ami azt sugallja, hogy a tumorsejtek ATP-t kizárólag a glikolízisből állítanak elő (35). Az elmúlt

évtizedek eredményei bebizonyították, hogy előbbi a legtöbb daganat esetében nem igaz (36). Sőt azt is igazolták, hogy egyes tumorsejtek még átmeneti ideig sem képesek túlélni OXPHOS nélkül (37). Ideális állapot a tumorsejtek számára, ha a környezethez, a növekedési igényekhez alkalmazkodva a Warburg glikolízis és az OXPHOS mechanizmusok egyensúlyban vannak és egyaránt elérhetőek (5. ábra).

Előbbiekhez a citromsavciklus köztestermékeinek folyamatos pótlása szükséges, ami több irányból is lehetséges pl. glikolízisből, glutaminolízisből, piruvát karboxilációból vagy zsírsav-oxidációból. Bizonyos esetekben, a piruvát alacsony szintje mellett, a piruvát beléphet a „csonka” citrátkörbe, ahol citrát termelődik, majd a metabolitok kiáramlanak a citromsavciklusból (kataplerózis). Ezek után a citoplazmában (acetyl-CoA-án keresztül) részt vesznek különböző folyamatokban, pl. a membránképződésben (38). Ilyenkor a sejt glutaminforrásból is képes betölteni a citromsavciklust (anaplerózis) (39), de fehérjék és más szénhidrátok is oxidálódhatnak, miközben ATP és citromsavciklus köztestermékek keletkeznek (40). Energiaszükség idején redukzív karboxilációban, pl. a zsírsavak oxidációja is képes a citromsavciklus feltöltésére, így szolgáltatva „üzemanyagot” az ATP szintézishez, miközben a termelt NADPH + H⁺ hozzájárul a redox egyensúly fenntartásához is (41). Az egyensúlyi reakciókban egyéb szubsztrátok pl. laktát (reverz Warburg hatás), ketontestek és aminosavak is oxidálódhatnak (42), biztosítva a sejtek számára extrém körülmények között is a nagyfokú bioenergetikai alkalmazkodást.

Előbbi források a citromsavcikluson keresztül a mitokondrium mátrixban NADH + H⁺-t és FADH₂-t termelnek, majd a belső mitokondriális membrán jól ismert (43) elektron-transzportlánc komplexein (komplex I – NADH dehidrogenáz, III – CoQH₂-citokrom C redukáz és IV – citokrom C oxidáz) a terminális oxidációban CO₂ és H₂O kilépés mellett ATP-t állítanak elő (44). Bizonyos enzimmutációk (citrát-szintáz, akonitáz (45), fumarát-hidratáz (46), szukcinát-dehidrogenáz (47) és izocitrát-dehidrogenáz (48)) a citromsavciklus, az OXPHOS működési egyensúlyát súlyosan megzavarhatják. Az enzimek kiesését (pl. fumarát-hidratáz, szukcinát-dehidrogenáz) vagy funkcióyerését (pl. izocitrát-dehidrogenáz) okozhatják, amelyeknek következményeként egyes metabolitok kóros mennyiségben halmozódhatnak fel. A fumarát, a szukcinát szint emelkedése és a D-2-hidroxi-glutarát (2-HG) megjelenése pl. olyan génregulációs zavarokhoz (metiláció, acetiláció), ill. HIF1 α stabilizációhoz

vezethet, amelyek a laktát tumornövekedést segítő hatásaihoz hasonlóan növekedési előnyt biztosítanak a tumorsejteknek. Az előbbi mennyiségében vagy szerkezetében megváltozott anyagcsere köztestermékek, amelyek segítik a tumornövekedést, az onkometabolitok.

A nyugvó sejtek, így az őssejtek metabolikus aktivitása ismertén alacsonyabb, mint a proliferáló vagy funkcionáló szöveti sejteké, a szükséges bioenergetikai háttérüket elsősorban az OXPHOS biztosítja. Az eddigi irodalmi adatok nem egységesek, de a tumorőssejtekre is inkább OXPHOS fenotípus jellemző (49). Ezeket az OXPHOS fenotípusú tumorőssejteket, „*dormant*” sejteket, illetve reaktivációjukat hozzák összefüggésbe a későbbi progresszióval, a megjelenő terápia rezisztenciával a legtöbb rossz prognózisú daganatban (50).

1.1.1.4 Fontosabb zsírsav anyagcsere-változások jelentősége daganatokban

Számos az energiaelőállítással és -tárolással vagy a sejtmembrán létrehozásával és működésével kapcsolatos folyamatban (51), akár jelátviteli folyamatokban és bizonyos gének aktiválásában is részt vesznek a lipidek, zsírsavak, szfingolipidek, szterollipidek, glicerolipidek és glicero-fosfolipidek. Ezekben a folyamatokban kulcsfontosságúak a zsírsavak, amelyeket egyetlen acetyl-CoA lánchosszabítással a zsírsav-szintáz (FAS) hoz létre (51, 52). A létrejött telített és telítetlen zsírsavakat a legkülönbözőbb módon használhatja fel (pl. β -oxidáción energianyerés, membránfelépítés), illetve raktározhatja a sejt, a szervezet. Adott helyzetekben a sejt raktározott, saját anyagait – a zsírsavakat és a koleszterolt – lebonthatja, majd anyagcsere köztestermékként felhasználhatja növekedés és osztódás közben (53-55).

A zsírsav bioszintézis egyik központi irányítója az SREBP transzkripciós faktor (56). Más szabályozó faktorokkal együtt hangolja össze a zsírsavak felépítéséhez szükséges enzimek együttműködését (pl. acetyl-CoA-liáz, a FAS és a deszaturázok) (57). A β -oxidáció és a zsírsavszintézis szabályozásában, fokozásában számos onkogén transzkripciós faktor, útvonal (c-Myc, MYCN, MYCL, β -katenin) vesz részt (58). A β -katenin onkogén szerepét a nem Warburg fenotípusú zsírsavfüggő növekedésű hepatocelluláris carcinoma sejtekben bizonyították az elmúlt években. (59). Jól ismert az

is, hogy a magas szabad zsírsavszint gátolja a GLUT4-függő glükózfelvételt (60) vagy a hipertrófizált zsírszövet fokozott TNF α termelése indukálja a szisztémás gyulladással kapcsolatos folyamatokat a tumor környezetében (61). Egyre jobban ismert és feltárt az elhízás, a diabétesz és a metabolikus szindróma – mint lipidmetabolizmust is érintő „kóros” állapotok – daganatkialakulást segítő összefüggése és hatása (61). A zsírsavszintézis sebességmeghatározó enzime az acetyl-CoA vagy CoA karboxiláz (ACC), így expressziója és aktivitása fontos a carcinogenezis folyamatában. Preklinikai modellkísérletekben igazolták, hogy tüdő carcinoma sejtek növekedéséhez és túléléséhez elengedhetetlen (62). A zsírsavanyagcsere egy másik fontos enzime a carnitin-palmitoltranszferáz (CPT1A), amely a lipidszintézissel ellentétes folyamatokban játszik fontos szerepet. A mitokondrium külső membránjában aktiválódott zsírsavak a mitokondrium belső membránba jutását segítik, ami a β -oxidáció feltétele. Érdekes, hogy a CPT1A overexpresszió is gyakori a legkülönbözőbb daganatok progressziójában (pl. emlő-, gyomor-, prosztata-, tüdődaganatokban, lymphomákban, myelomákban), míg az expresszió csendesítése egyértelműen gátolja a β -oxidáció folyamatait (63). Daganatok esetében a CPT1A fokozott termelése és aktivitása inkább a lipidlebontó (lipolitikus), mint lipidszintetikus folyamatokkal áll összefüggésben. A lipidanyagcsere dinamikus alkalmazkodása a daganatos progresszióban fontos tényező; a sejtek túlélési és proliferációs igényeinek megfelelően biztosítja a sejtek metabolikus alkalmazkodását, plaszticitását (63). A lipidanyagcsere-gátlók várható eredményei kombinációs terápiában azzal is összefügghetnek, hogy már egy tényező gátlása is a lipidmetabolizmus bonyolult szabályozásában a sejtek metabolikus alkalmazkodását blokkolhatja (64).

1.1.2 Metabolikus heterogenitás és adaptációs mechanizmusok a daganatok növekedésében, progressziójában

Az előzőekben áttekintett anyagcsere-útvonalak eltolódásai, arányváltozásai különböző metabolikus fenotípusokat határozhatnak meg. Azok a sejtek, amelyek képtelenek alkalmazkodni a megváltozott bioenergetikai feltételekhez, átmeneti proliferációgátlást követően nekrozis, apoptózis vagy egyéb mechanizmusok útján elpusztulnak. Azok a sejtek azonban, amelyek metabolikusan is gyorsan alkalmazkodnak (rugalmasak, metabolikus plaszticitásuk jelentős) előnyre tesznek szert a környező

sejtekkel szemben. Ilyen esetekben vagy az adott útvonalak elemeinek expressziója, aktivitása nő meg igen gyorsan, vagy a sejtek már alapesetben is rendelkeznek többféle, gyorsan aktiválható meglévő útvonal elemeivel a metabolikus hálózatban. A legújabb vizsgálatok szerint utóbbi több útvonal gyors elérési lehetőségével rendelkező sejtek, az ún. hibrid metabolikus fenotípusú sejtek csoportját alkotják. Ezek egy időben jelentős aerob glikolízis és OXHPOS aktivitással vagy akár más bioenergetikai folyamatok (pl. autofágia, glutaminolízis, protein és egyéb más aminosavak lebontása) gyors aktiválására, a citromsavciklus sokirányú közttestermék feltöltésére képes kapacitásokkal rendelkeznek (65).

A növekvő szolid daganat hipoxiás magja, a véráramba kerülés, az epithelialis-mesenchymalis átalakulás (EMT) és a kolonizált mikroköznyezethez való alkalmazkodás mind olyan változás a tumorsejtek életében, ami metabolikus adaptáció nélkül nem mehet végbe. Ez a típusú alkalmazkodóképesség (plaszticitás) elengedhetetlen a tumorsejtekben (66). Az alkalmazkodás során megjelenő tulajdonságok egymást kölcsönösen befolyásolhatják, és összefüggnek különböző onko- és szupresszorgének (*MYC*, *TP53*, *PTEN*, *TSC1/2*) (67, 68) vagy jelátviteli útvonalak (PI3K/mTOR/Akt, Ras) (69, 70) szabályozatlan túlműködésével is. A HIF1 α egyik legjobban ismert hatása az, hogy indukálja az angiogenezist VEGF termelésén keresztül, magas szintje számos, további jelentős metabolikus átrendeződést is eredményez: növeli pl. a glikolízis számos fontos enzimének, köztük a HK2-nek a kifejeződését, fokozza a glükóz receptorok expresszióját, a glükóz- és a glutaminfelvételt, a glutaminolízist, a csonka citrátkör alapú zsírsavszintézist (71). Ez a kompenzáció olyan bioenergetikai teremthet meg a sejtek számára, ami elősegíti tovább növekedésüket és túlélésüket.

Tápanyaghiány megfelelő vérellátás mellett is felléphet, ilyenkor csökken az ATP-termelés és aktiválódik a sejtek energiaszintjének őre, az AMP aktivált protein kináz (AMPK) (72). Az AMPK foszforilált állapotban a lebontó folyamatokat támogatja (73), növeli a glükóz- és a zsírsavfelvételt, valamint a glutamin citrátciklusba való betöltését is (74). Gátolja az mTOR-aktivitást, a glükoneogenezist, a glikogénraktározást (75), illetve aktiválja a P53-at (76) is. Az mTOR-aktivitás csökkenésével párhuzamosan beindítja a lizoszóma-biogenezist és az autofágiát, így a tumorsejtek alacsonyabb metabolikus aktivitási szinten is túlélhetnek. A tumorsejtekben a magas HIF1 α szint inkább a glikolízist támogatja, míg az AMPK az OXPHOS-t (65, 77).

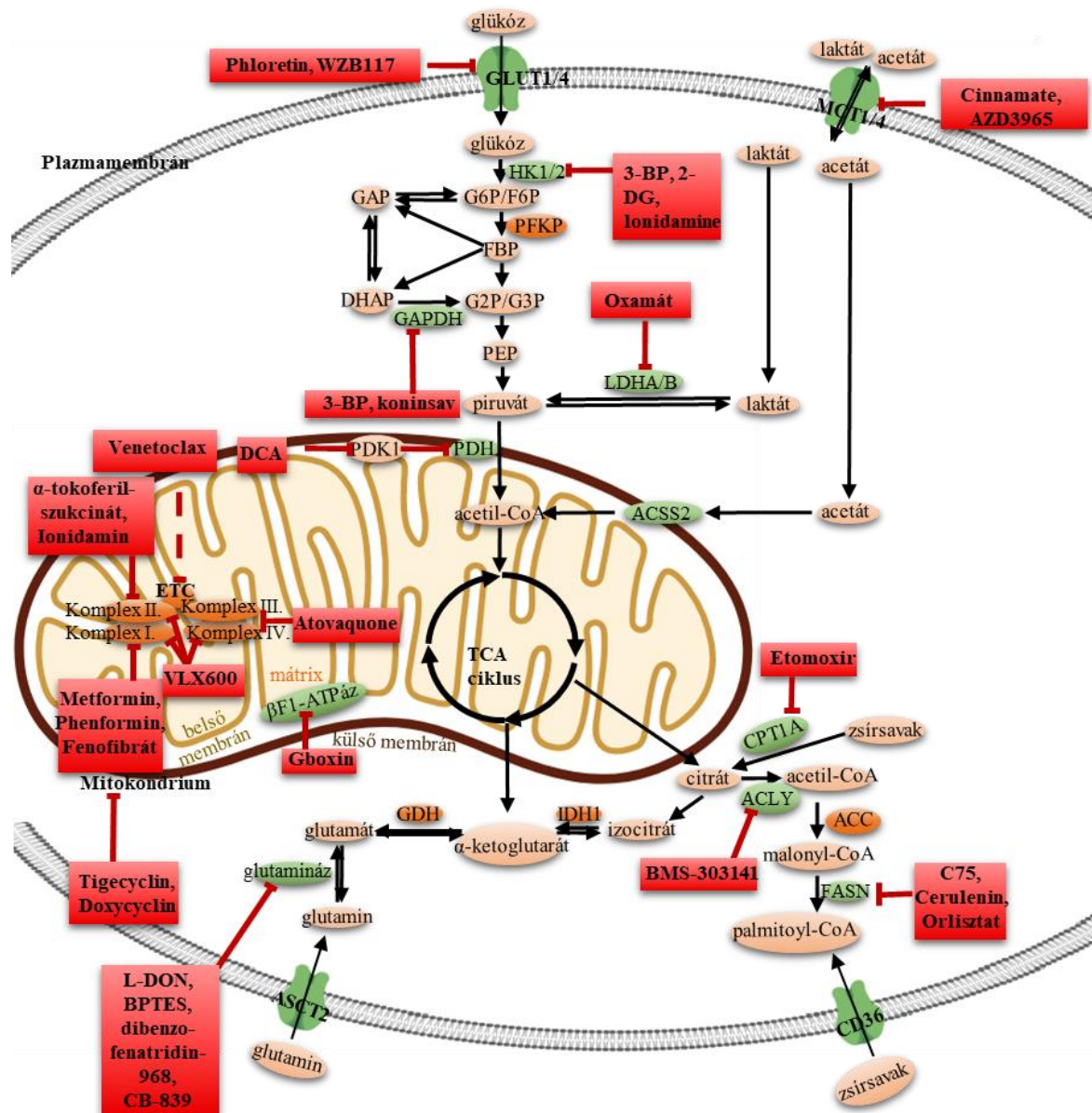
A tumorsejtek migrációja, véráramba jutása, inváziója, áttétképzése a malignitás fontos jellegzetességei, a bekövetkező EMT átalakulások (78) is hatással lehet a sejtek anyagcseréjére, metabolikus fenotípusára. Eddigi irodalmi adatok alapján ezek az EMT közben bekövetkező metabolikus változások sejttípus függőek. Egyes tumorsejtekben a glikolitikus flux, a GLUT3, a glutaminolízis, a GLS1 szint emelkedik meg (79), míg más sejtekben a glikolízis és párhuzamosan az OXPHOS lesz aktívabb, a zsírsavszintézis aktivitása pedig csökken (80). Arra is van példa, hogy metabolikus változás indukál EMT-t; fokozott CD36-on keresztüli zsírsavfelvétel vagy pszeudohipoxia, illetve akár indukált glikolízis is beindíthatja bizonyos tumorsejtek esetében az EMT-t (81, 82). A véráramban keringő tumorsejtekre leginkább az OXPHOS és a kiegyensúlyozott redoxi állapot fenntartása jellemző (83). A metasztatikus sejteknek a kolonizált terület mikrokozonyezetétől függően újból változnia kell. Érdekes, hogy a májba metasztatizáló sejtek inkább Warburg fenotípusúak (tejsavas glikolízis) (84), ami a csontáttétek esetében is jellemzőbb (85). Ugyanakkor az agyi- és a tüdőmetasztázisokban a citrátciklus működése jelentősebb, az agydanatok esetében pl. a gamma-amino-vajsav (GABA) metabolikus hasznosítása (84, 86), míg tüdőáttétek esetén a glutaminhasznosítás állhat a háttérben (87).

1.1.3 Metabolikus támadáspontok, a daganatsejtek anyagcseréjét befolyásoló hatóanyagok és célpontjaik, jól ismert szerek metabolikus off-target hatásai

A Warburg-effektus újrafelfedezése óta egyre nagyobb figyelmet kaptak a glikolízisgátló fejlesztések. A célfehérjék a tumorsejtekben nagyobb mennyiségben és/vagy magasabb aktivitással előforduló glikolízis enzimek lehetnek (88), így: glükóz transzporterek (phloretin, WZB117) vagy MCT-k (Cinnamate, AZD3965), HK2 (2-deoxi-D-glükóz, lonidamine), GAPDH (3-brómpiruvát, koningic acid), LDHA (oxamát), vagy PDK (diklóracetát) (6. ábra). A glükóz transzporter-gátlók szelektív, kis molekulásúlyú inhibitorok, amelyek a glükózfelvétel gátlásán keresztül energiahányt, majd sejthalált okoznak (89). A WZB117, egy bisz-hidroxi-benzonát vegyület, gyors, szelektív és irreverzibilis GLUT1-gátlást okoz. A WZB117 ciszplatinnal és paclitaxellel kombinációban is szinergikus hatásokat mutatott tüdő- és emlődaganatos sejteknél *in vitro* és *in vivo* (89). Sajnálatos azonban, hogy a glükóz transzporter-gátlók gyakran már

a fázis I-es kísérletekben nem tolerálható mellékhatásokat okoznak (pl. miokardiális infarktus, tüdőgyulladás, légzési elégtelenség, nyaki verőér elzáródás) (88). A tumorsejtekben a glikolízis egyik sebességmeghatározó enzime a nagy mennyiségben megjelenő HK2, gátlóival – Lonidamin (indol származék) és a 2-dezoxi-glükóz (2-DG kompetitív antimetabolit) –, a klinikai fáziskísérletek még folynak. A Lonidamin biztató eredményeket mutatott doxorubicinnel kombinációban (90), a 2DG azonban toxikusan magas dózishasználatot igényel (91). Az eddigi legsikeresebb vizsgálatok a GAPDH-gátló koninginsav (GAPDH aktív oldalhoz köt) (92), és a piruvát analóg 3-brómpiruvát (3BP) (93) (GAPDH-t és a HK-t egyszerre gátolja) kezelések voltak. 2016-ban azonban leállítottak minden glikolízisgátló fázisvizsgálatot, mivel több beteg belehalt a toxikus mellékhatásokba (94). Lehetőségként a glikolitikus fenotípusú sejtek esetében laktát- és piruváttranszport, illetve az MCT-k gátlása (AZD3965 és Cinnamate fázisvizsgálatban) (15) maradt, illetve a glikolízis gátlása indirekten más kezelések *bystander* hatásával is megvalósulhat, pl. az mTOR-gátlók (ld. később) (95).

A citromravciklus feltöltésében, az aminosavanyagcserében és a zsírsavszintézisben fontos szerepe van a glutaminmetabolizmusnak. A legrégebbi klinikai kísérletben megjelent—mindkét GLS izoformát gátló inhibitor a 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (L-DON), nem elégséges szelektivitása és mellékhatásai miatt volt sikertelen (96). A GLS két izoformáját gátolja a bisz-2-(5-fenilacetamid-1, 2, 4-tiadiazol-2-il) etil szulfid (BPTES) és a dibenzofenantriridin-968 is, előbbi inkább a GLS, míg utóbbi mindkét izoformát egyformán gátolja (24, 96). A BPTES minimális toxicitású ugyan, de nem a GLS aktív centrumához köt, így nem kompetitív hatású, ennek ellenére már több daganatban leírták tumor növekedés csökkentő hatását (97). Az allosztrérikus GLS inhibitor, a dibenzofenantriridin-968, a KGA és GAC aktivitását is gátolja, tumornövekedést gátló hatását szintén igazolták (25, 98). Kevésbé toxikus glutaminázgátló komponens a 2-(piridin-2-il)-N-(5-(4-(6-(2-(3-(trifluorometoxi) fenil) acetamid) piridazin-3-il) butil)-1, 3, 4-tiadiazol-2-il) acetamid (CB-839) (97), előbbieknél sokkal hatásosabb, mert a KGA és GAC izoenzimek aktivitását jobban gátolja.



6. ábra. Metabolikus gátlószerek és támadáspontjaik összefoglalása. A legfontosabb terápiásan is célozható metabolikus enzimeket és transzportereket zöld színnel, míg a különböző gátlószereket piros színnel emeltük ki a folyamatokban.

A mitokondrium bioenergetikai funkciógátlásának két fő kutatási iránya van: a mitokondriális proteinszintézis, illetve az OXPHOS folyamatának gátlása. Előbbiben a tetraciklin típusú antibiotikumok rendkívül hatásosak. Például a tigecycline önmagában és imatinibbel kombinálva toxikus a krónikus myeloid leukémia őssejtjeiben is *in vitro* és *in vivo* modellekben (99). Az első klinikai tesztek emlődaganatos betegeknél doxycycline-nel (két hétig alkalmazva a műtét megelőzően), szignifikánsan

csökkentették az aldehid-dehidrogenáz (ALDH) 1 és CD44 őssejtmarkerek expresszióját a tumorszövetben (100). Az eredmények arra utalnak, hogy a tetraciklinek a tumorőssejtek anyagcseréjét képesek gátolni (101). Az OXPHOS, komplex I gátló biguanid anti-diabetikus metformin és phenformin az AMPK-t aktiválja, gátolja a mitokondriális ETC komplex I-et (OXPHOS gátlás és ATP szint csökkenés), az mTOR kinázt és a HIF1 α -t (102) is. Metabolikus gátló hatása összetett – a klinikai eredmények elsősorban a mellékhatások miatt ellentmondásosak ezekben az esetekben. A komplex I gátló fenofibrát szintén biztató tumornövekedés-gátló hatását is igazolták (103). Más nem-daganatellenes szerek *off-target* hatásai, például a komplex II gátló E-vitamin analóg α -tokoferil-szukcinát és a ionidamin daganat növekedés gátló hatásai is felmerülnek (103). A komplex III és IV gátló malária ellenes atovaquone (103) és a több komplexet (I, II, IV) is gátló vaskelátor a VLX600 (104) vizsgálata is zajlik. Egyes magas-affinitású OXPHOS-gátlók már klinikai vizsgálatokba kerültek (BAY87-2243 (105), IACS-010759 (106), ME-344 (107)), míg más, az elektrontranszport láncot indirekt módon gátló kezeléseket (venetoclax) preklinikai vizsgálatokban glutaminolízisgátlókkal kombinációban tesztelnek (108). Ezen eredmények szerint az F0F1 ATP-szintáz gátló Gboxin „bioenergetikai katasztrófát” okoz a sejtekben (109).

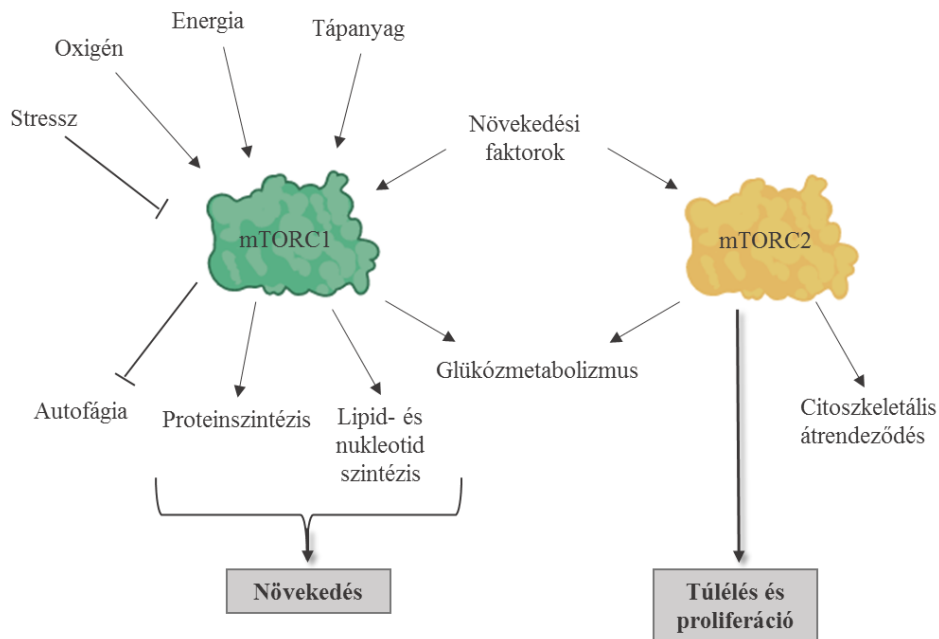
Több potenciális lipidanyagcserében érintett target vizsgálata zajlik. Az exogén zsírsavfelvétel gátlásában a CD36 ígéretes célpont (110), de az SREBP-1 transzkripció faktor mint központi szabályozó gátlása nem járt eredménnyel (111). A FASN-nek több inhibitora (C75, cerulenin, orlistat) preklinikai vizsgálatokban bizonyította tumornövekedést gátló hatását, de egyes esetekben párhuzamosan a sejtek áttétképzésével összefüggő sajátosságai jelentek meg és a metasztázisképzés fokozódott a kezeléseken (112, 113). Az ACLY aktivitását gátló inhibitorok is elérhetőek, azonban ezeknek egyéb *off-target* hatásai nehezítik jövőbeli felhasználásukat (114). Ígéretes, a β -oxidáció (115) első sebességmeghatározó lépésében szerepet játszó CPT1A-gátló etomoxir várható hatása, mert mellékhatás profilja kedvezőbb (116).

Az autofágia tumorsejtek túlélését befolyásoló hatásai egyre nagyobb figyelmet kapnak. Nem véletlen, hogy az autofágiát indukáló és gátló kezelőszerek hatásának vizsgálata is egyre több tanulmányban jelenik meg, pl. a jól ismert autofágiagátló és maláriaellenes chloroquine kemoterápiás kombinációi (117).

A metabolikus gátlók kombinálása a hagyományos kezelésekkel (akár kemo-, akár sugár- vagy célzott terápiás kezelések) vagy akár több metabolikus inhibitor kombinált hatásának vizsgálata segítheti a terápia rezisztencia áttörését. Olyan, már törzskönyvezett protokollokat is ismerünk, ahol a hatás hátterében a metabolikus adaptáció (118, 119) az egyik target. Bizonyos eredmények alátámasztják, hogy az OXPHOS fokozódása összefügg a terápia rezisztenciával, illetve, egyes tumorsejtek érzékenyíthetők zsírsavoxidáció, OXPHOS és/vagy mitokondriális fehérjeszintézist gátló kezeléssel (120). Több anyagcsere-útvonal együttes gátlása pl. a metformin vagy phenformin glikolízisgátló kombinációja akár nem várt sikereket is hozhatnak. Mindezek felhívják a figyelmet a metabolikus karakterizálás jelentőségére és a metabolikus gátlók lehetséges alkalmazására a jövőben.

1.2 mTOR jeletviteli útvonal szerepe a daganatok anyagcseréjében

Az mTOR (mammalian target of rapamycin) kináz mint jeletviteli hálózati csomópont összegezve a sejt állapotáról és környezetéről érkező információkat (sejtek energia-, és tápanyag-ellátottságát, a növekedési és környezeti faktor receptorok útvonalainak aktivitását), a sejt aktuális állapotának megfelelően szabályozza a sejtproliferációt, a fehérjeszintézist és a túlélés folyamatait. A kináz szerkezete evolúciósan konzervált, eddigi ismereteink szerint a legtöbb eukariótában két eltérő proteinkomplexben lehet jelen, ezek az mTORC1 és az mTORC2. A jól ismert mTOR szabályozott funkciók mellett a komplexek szerepe anabolikus, illetve katabolikus folyamatokban, a tápanyag felhalmozásban, az autofágiában és a sejtanyagcsere egyensúlyának fenntartásában is egyre jobban jellemzett (7. ábra).

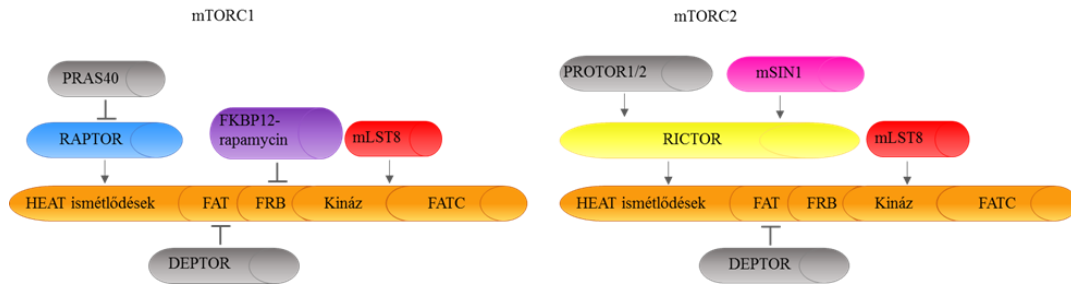


7. ábra. Az mTORC1 és C2 komplexek legjobban ismert szabályozó hatásai. A két mTOR komplex sejtek növekedését, proliferációját, és túlélését érintő hatásai és aktivitásukat befolyásoló tényezők. ((121) alapján)

1.2.1 Az mTOR kináz és komplexei: mTORC1 és mTORC2

Az mTOR kináz funkcióinak, szabályozási szerepének megértését és vizsgálatát egyaránt nehezíti, hogy két komplexe között strukturális, funkcionális és inhibitorokkal szembeni érzékenység különbségek is vannak; jelenlegi gátlóknak specifikussága nem egyértelmű, valószínűleg a két komplex egymást befolyásoló hatásai miatt. Az mTOR funkció zavarainak jelentőségét alátámasztja, hogy a jelátviteli hálózat központi részeként a komplexek több olyan fehérjével és jelátviteli útvonallal is kapcsolatban állnak, amelyeknek mutációi (pl. PI3K, TSC1/2, PTEN stb.) és nem megfelelő működése gyakori daganatokban, illetve egyéb kórfolyamatokban (121).

Az mTOR génről (I-es kromoszóma) átíródó 289 kDa mTOR szerin/treonin kináz központi eleme a két eltérő szerkezetű, szerepű és inhibitor érzékenységű mTORC1 és C2 komplexnek (122).



8. ábra. Az mTOR fehérje doménjei és alegységei. Az mTORC1 (A;) és C2 (B;) komplex alegységei és szabályozói (mTORC1 - mTOR kináz, RAPTOR, mLST8, FKBP12, DEPTOR, PRAS40,; mTORC2 - mTOR kináz, RICTOR, mLST8, mSIN1, PROTOR1/2, DEPTOR) és az mTOR kináz fehérje domén szerkezete (narancssárga) (HEAT: Huntington, elongációs faktor 3, PR65/A; FAT: FRAP, ATM, TRRAP; FRB: FKBP12-rapamycin-kötő; FATC: FRAP-ATM-TRRAP-C-terminál). ((121) alapján)

Az mTOR fehérjét (8. ábra) jellegzetes HEAT-ismétlődések, FAT (FRAP, ATM és TRRAP), KD (kináz domén), FRB (FKBP12-rapamycin kötő) és a FATC (FAT C-vég) domének (122, 123) alkotják. Az mTORC1 és C2 komplex további közös elemének az mLST8-nak a komplexek stabilitásában van szerepe (124-126), míg közös negatív regulátora a komplexnek a DEPTOR fehérje (127). A RAPTOR az mTORC1 karakterisztikus vázfehérjéje (128, 129), az mTORC1 komplex végleges, speciális szerkezetének kialakításában van szerepe. Biztosítja, hogy az mTOR kináz fehérje FRB régiója az FKBP12, illetve FKBP12-rapamycin számára hozzáférhető legyen. A RAPTOR segíti annak a szerkezetnek a kialakulását is, ami megfelelő térbeli helyzetbe hozza az mTOR kináz domént és célfehérjék szerin, threonin aminosavait, pl. a PRAS40-et (40 kDa prolin-gazdag Akt szubsztrát) (127, 130). Az mTORC2 vázfehérjéje a RAPTOR helyett a RICTOR, egyéb fehérjék még az mTORC2 komplexben: a PROTOR1/2 és az mSIN1 (122, 131, 132). Az mTORC2-ben az mTOR kináz FRB doménje a komplex belső részében található, így az FKBP12-rapamycin nem képes kötődni az mTORC2 komplexhez, ez teszi ellenállóvá a rövidtávú rapamycin kezeléssel szemben. Egyes eredmények szerint a hosszútávú rapamycin kezelés indirekt módon képes gátolni az mTORC2 aktivitását, az mTORC1 komplex hatásainak mTORC2 komplex funkciókhoz szükséges hatásain keresztül, de ehhez hosszabb kezelés szükséges. Ezek a kísérletek arra utalnak, hogy a C2 komplex elemeinek termeléséhez és a komplex összeszereléséhez mTORC1 aktivitás kell (133, 134).

1.2.2 Az mTOR komplexek aktivitásának változásai, daganatbiológiai jellegzetességei

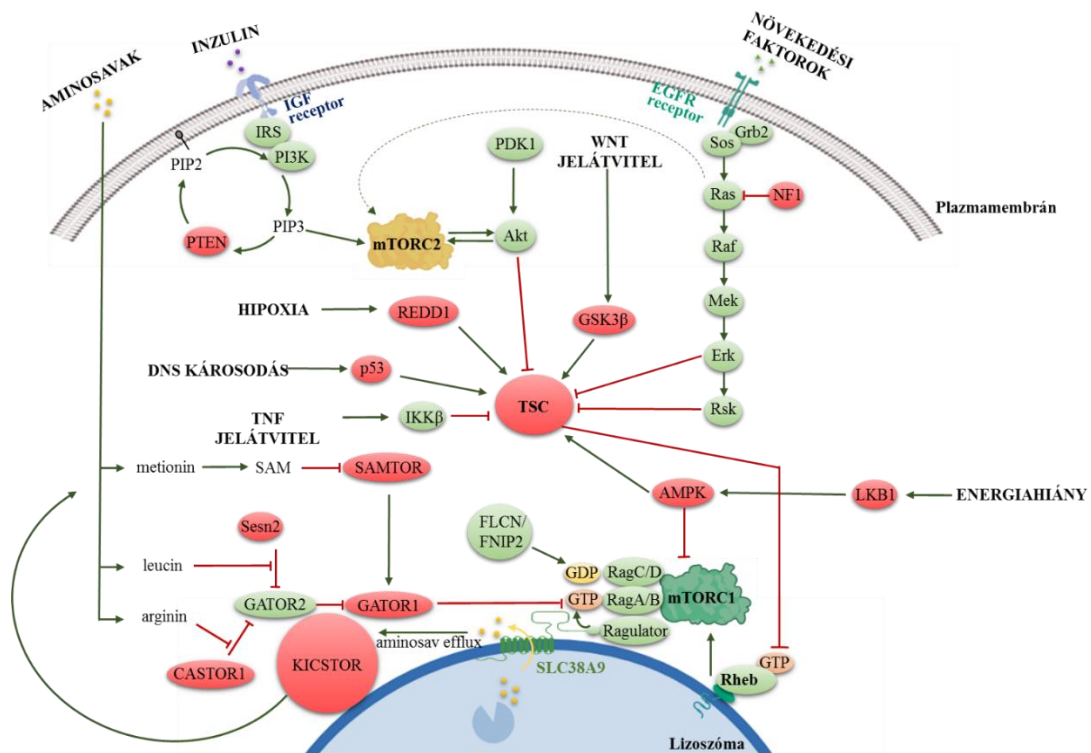
Az mTOR komplexek a jelátviteli hálózat több útvonalával közvetlen kapcsolatban állnak (9. ábra). Az Rheb és Rag GTP-ázok nemcsak aktiválják (9. ábra) (135), de sejten belüli elhelyezkedését is meghatározzák az mTORC1-nek. Tápanyag- (aminosavak, glükóz) és energiadús környezetben az aktivált Rag heterodimer, a citoplazmából a lizoszóma felszínéhez horgonyozza az mTORC1-et, amit az aktív Rheb így aktiválni képes (136). Az Rheb gátlásáért a növekedési faktor útvonalak szabályozása alatt álló TSC1/2 komplex felelős (137), GTP-áz fehérjeként a Rheb aktív (GTP-kötött) és inaktív (GDP-kötött) állapota közötti változásokat kontrollálja a növekedési faktorok, PI3K/Akt útvonal aktivitásának függvényében (138). Az Akt foszforilálja, gátolja a TSC2-t (pl. inzulin hatás, IGF-1-IGF1R szignál), ekkor a TSC1/TSC2 fehérjék elválnak a lizoszómális Rheb-mTORC1 komplextől, a gátlást megszüntetve (139, 140). Ezen a ponton számos más jelátviteli útvonal is aktiválhatja az mTORC1-et, pl. a RAS tirozin kináz útvonal tagjai (ERK, RSK) (141, 142), a Wnt és a TNF jelátviteli útvonal (143). Negatív feedback mechanizmus az mTORC1 komplex szabályozásában az mTORC1 jól ismert targetjén, az S6K1 aktivációján keresztül valósul meg. A foszfo-S6K1 foszforilálja az IRS-1-et, ami gátolja a PI3K-Akt útvonalat (130). Az mTOR kináz aktivitását szabályozó egyéb hatások között jól ismert a sejtek glükóz és ATP szintje, előbbiek hiánya aktiválja a sejt energia szenzorát, az AMPK-t. Az AMPK közvetlenül a RAPTOR foszforilálásával, valamint közvetetten a TSC2-n keresztül gátolja az mTORC1-et (144). Az aminosavak mennyiségi változásai is befolyásolják az mTORC1 aktivitását, a leucin és az arginin nélkülözhetetlenek hozzá (145). A Rag GTP-ázok aktivitásának szabályozásában a GATOR1-GATOR2 citoplazmatikus aminosav érzékelő komplex, alacsony aminosavszint esetén hidrolizálja a RagA/B kötött GTP-t, így gátolva az mTORC1 kötését (146). Metionin és S-adenozilmetionin (SAM) hiánya, SAM szenzorként (SAMTOR) a GATOR1 kötésével gátolja az mTORC1-et (147). A glutamin szabályozó hatása még pontosan nem ismert, de az eddig adatok szerint ez a hatás Rag-független (148).

Hipoxia esetén, az oxigénfüggő hidroxilázok aktivitása azonnal megszűnik, eredményeként stabilizálódik a HIF1 α , ez fokozza a REDD1 termelést, felszabadítja TSC

komplexet, így gátolva az mTORC1-et (149). Hasonló az előbbihez a DNS károsodások, sérülések mTORC1 gátlásában leírt szabályozó hatása is. Ebben az ATM-p53 mediált AMPK β , PTEN és TSC2 fehérje expressziós változásoknak jut a legnagyobb szerep (9. ábra) (150).

Az mTORC2 aktivitását szabályozó mechanizmusok az mTORC1 szabályozásánál kevésbé ismertek, elsődleges szabályozói a növekedési faktorok a PI3K útvonalon keresztül. Ismert, hogy az mSin1 az mTORC2-n belül inzulin hiányában gátolja az mTORC2 aktivitását (151). Az mSin1 PIP3, a PI3K útvonal, az inzulin vagy más növekedési szignál aktivációját követően az mTORC2 és Akt plazmamembrán közeli áthelyezéséért felel, ez ad lehetőséget a kölcsönös foszforilációra, aktivációra (152). Modellkísérletek alapján ezekben a folyamatokban a kis GTP-ázoknak (Rac1, Rap1 és Ras) fontos szerepe van, kötnek az mTORC2-höz, és ezen keresztül befolyásolják a kemotaxist és a növekedést (153). Kimutatták, pl. hogy az mTORC2-t, az mSin1 hatására már a membránnál aktiválhatja a Ras-t (154). Mivel az mTORC1 aktivitásnak negatív szabályozója az IRS gátláson keresztül az mTORC1-S6K1 (negatív feedback), a rapamycin mTORC1 gátló hatása kiiktatva az előbbi gátlást fokozhatja PI3K/Akt útvonal aktivációját ezen keresztül az mTORC2-t is (155). Az mTORC2-függő folyamatok is magas energiaigényűek, így az ATP szint csökkenése az AMPK-n keresztül negatívan befolyásolja az mTORC2 aktivitását is (156).

Az mTOR kináz aktivitás szabályozásának fontos tényezője az ubiquitin proteaszóma rendszer is. Az mTOR kináz degradációjában részt vesz az *FBXW7*, amelynek funkcióvesztő mutációit is összefüggésbe hozták az mTOR hiperaktivitással egyes tumortípusok esetében (157). Az mTOR, a PI3K/Akt/mTOR tengely részeként a jelátviteli hálózatban csomóponti szerepet játszik, két komplexének számos target fehérjéje, mechanizmusa ismert. A jól ismert onkogén jelátviteli zavarok többsége, pl. a receptor tirozin kinázok közül az EGFR, FGFR (158) a PIK3CA, RAS, Akt aktiváló mutációinak (159) vagy a negatív regulátor tumor szupresszorok pl. PTEN vagy (TSC1/2) funkcióvesztésének szerepe már jellemzett az mTOR hiperaktivitásban. Nem véletlen, hogy az mTOR kináz jelátvitel a normál szövetekhez képest fokozott aktivitású a daganatok közel 80%-ában, és ezzel hozzájárul az adott tumor növekedéséhez és a tumorsejtek túléléséhez (121).



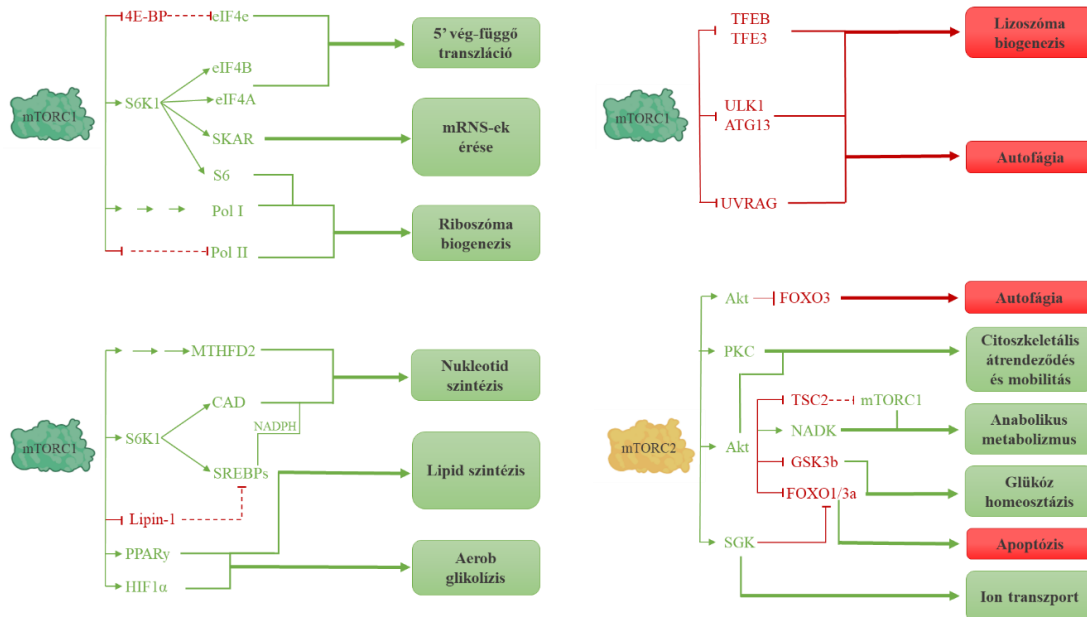
9. ábra. Az mTORC1 és C2 komplexek aktivitását befolyásoló tényezők. Az mTOR komplexek a jelátviteli hálózat központi elemeiként számos jelátviteli úvonál, fehérje pozitív (zöld színnel jelzett) vagy negatív szabályozó (piros színnel jelzett) hatása alatt állnak. A szabályozó folyamatok részletesebben a szövegben szerepelnek ((121) alapján)

1.2.3 Az mTOR jelátviteli útvonal szerepe sejtfunkciók, elsősorban a metabolikus folyamatok szabályozásában

Az mTOR komplexek szerteágazó jelátviteli kapcsolatai és target fehérjéinek sokfélesége magyarázza központi funkcióit (10. ábra).

Az mTORC1 célfehérjéi részt vesznek katabolikus és anabolikus folyamatok szabályozásában (fehérje-, zsírsav-, nukleotid- és ATP-szintézis, ill. az autofágia gátlása). Az mTORC1 legjobban ismert funkciója a fehérjeszintézis támogatása az eukarióta iniciációs faktor 4E-kötő fehérjék (4E-BP-k) és a p70 S6-kináz 1 (S6K1) foszforiláción keresztül. A 4E-BP1 fehérje foszforilációja megszünteti a eIF4E kötését, így a gátlás alól felszabadult iniciációs faktor elindíthatja az 5'végről az mRNS translációt (160). Az aktivált S6-kináz (S6K1) foszforilálja, aktiválja a riboszomális S6 fehérjét (S6) (161), az RNS polimeráz I és III-t (Pol I/II), felgyorsítja a transláció

sebességét (162). S6K1 a fehérje szintézis folyamatában szabályozza az mRNS érést, aktiválva a SKAR (S6K1 Aly/REF-like target) fehérjét. (163). Előbbi szabályozási hálózatnak, az mTORC1-függő fehérje szintetikus apparátus biztosításában van nagy jelentősége, ami számos onkogén fehérje szintézisekor szükséges. Ezzel függ össze az mTOR inhibitorok jól ismert proliferáció, tumornövekedés gátló hatása is, pl. ciklin D1 túltermelés gátlásán keresztül (164).



10. ábra. Az mTORC1 és C2 komplexek ismertebb a fejezetben tárgyalt target fehérjei és szabályozó funkciói.

Az mTOR komplexek a jelátviteli hálózat központi elemeiként számos sejtfunkciót szabályoznak, segítenek (zöld színnel jelzett) vagy gátolnak (piros színnel jelzett). A szabályozó folyamatok részletesebben a szövegben szerepelnek. ((121) alapján)

Az mTORC1 az SREBP1/2 és PPAR γ transzkripciós faktorok aktivitásának szabályozásával vesz részt az új membránok szintézisét biztosító zsírsav- és lipidfelépítő folyamatokban. Alacsony szterol szint mellett a SREBP-k az endoplazmatikus retikulum membránról áthelyeződnek a sejtmagba, ahol mTORC1 aktivitás esetében, az mTOR kináz foszforilálja a lipin 1-et, majd a SREBP-k serkentik a *de novo* lipid és koleszterol szintézist (165). Az mTORC1-nek a karbamil-foszfo-transzferáz (CAD), illetve a metil-tetrahidro-folát-reduktáz (MTHFD2) szabályozásán keresztüli hatásával a *de novo* purin (166) és pirimidin szintézisben is fontos, a sejt növekedési igényeit támogató szabályozó szerepe van (167). Az új sejtek keletkezésekor szükséges makromolekulák szintéziséhez

azonban rengeteg energiára és szénforrásra van szükség. Ezzel összefüggésben az mTORC1 a glükózanyagcserét, glükózfelvételt, glükózlebontó és a mitokondriális folyamatok funkcióit is segíti, pl. serkenti a mitokondriumok keletkezését is (168). A hipoxiás vagy pszeudohipoxiás génaktiváció, illetve a prolil hidroxilázok (PHD) gátlása fokozza a HIF1 α függő glikolitikus enzimek átírását (GLUT1, MCT1, HK2, LDHA). Ez a glikolízis, elsősorban a Warburg-effektus irányába tolja az energiatermelő folyamatokat (169), számos makromolekulának a felépítő folyamat energiaigényét (NADPH, ATP) és szénforrásait biztosítva a 4E-BP1 transzkripciós aktivitástól függően. Párhuzamosan glikolitikus enzimek expressziójának fokozása mellett a pentóz-foszfát út enzimeinek szintézisét is fokozza az mTORC1 (170).

Bioszintetikus építőelem- és energiabőség mellett a sejtnak nem kell saját belső anyagait lebontani, az mTORC1 – illetve az mTORC2 is – gátolja a lizoszómák funkcióit és az autofágia folyamatait (171). Foszforilálva transzkripciós faktorokat (transcription factor EB – TFEB; transcription factor E3- TFE3) a lizoszomális gének expresszióját, illetve az ULK1 és ATG13 autofagoszóma fehérjéket gátolja az mTOR komplexek aktivitása (171). Az mTORC1 foszforilálja az UVRAG fehérjét is, ami a Rab7-tel és a HOPS-szal kontrollálja a korai és késői autofágia lépéseit (172). Ismert azonban az is, hogy az mTORC1 és az autofágia szabályozási kapcsolata a sejtosztódás közben megszűnhet. A CDK1 gátolja az autofagoszóma képződését, hogy a magmembrán felbomlásakor megvédje a genomot a lebontási folyamatoktól (173). Az eddigi közlemények alapján az Akt/mTORC2 szabályozó szerepéről az autofágiában még keveset tudunk, az mTORC1 és az autofágia szabályozási kapcsolata pedig még csak részben ismert (az mTORC1 szerepe feltáráásra vár a teljes és a szelektív autofágiában pl.).

Az mTORC2 három (RICTOR, mTOR, mLST8) fő alkotóelemének kiütése gátolja a sejtváz átépülését, a kemotaxist és a migrációt, ezek az eredmények az mTORC2 komplex szerepét hangsúlyozzák a daganatok áttétképzésében. Az mTORC2 komplex kiütése az előbbi funkció gátlások mellett nem csökkenti az S6K1, csak a PKC α foszforilációját (122). Így azonosították az mTORC2 targetjeként a PKC α -t, ami a sejtváz átépülésének egyik irányítója. A jelenlegi adatok alapján az mTORC2-függő foszforilációs folyamatok szabályozzák a PDK1, SGK1 és az Akt kináz aktivitásokat is (10. ábra) (174-176). Az Akt fehérje több foszforilációs motívumát elsősorban a növekedési faktor útvonalakkal

összefüggő PI3K aktiválja. A Ser473 aminosav foszforiláció, ami az Akt teljesebb foszforiláltsági állapotát jelenti és bizonyos funkciókhoz mindenképpen szükséges, azonban ez csak mTORC2 aktivitás mellett történhet meg (177). Az Akt széleskörű sejtbioológiai, tumorbiológiai hatása érinti az apoptózist, a túlélés, a migráció és az autofágia szabályozását, de funkciói sejttípustól függően is jelentősen eltérhetnek. A GSK3b aktivitásának fokozásával gátolja pl. az apoptózist és irányítja a glükóanyagcserét (176). Lényeges szerepe van még a stresszfaktorok elleni védelemben a FOXO1/3a transzkripciós faktorok és NAD kináz (NADK) irányításával (178, 179). További szerepe lehet az mTORC1 és mTORC2 komplexek közötti aktivitás szabályozásban is, pl. a TSC2 gátlásával és az mSin1 foszforilálásával (180). Ezek alapján az mTORC2 és az Akt kölcsönös visszacsatolási mechanizmusokon keresztül irányíthatja a két komplex celluláris helyzetét és aktivitását (152). Ezt támasztja alá, hogy az mTORC2 aktivitása szükséges a FOXO1/3a és nélkülözhetetlen a TSC2, GSK3b foszforilációhoz (125), de az Akt aktivitása kevésbé szükséges az mTORC2 aktiválásában, mint az SGK1.

1.2.4 mTOR jelátviteli útvonal gátlók – klasszikus és új generációs inhibitorok

A rapamycint – eredetileg gomba ellenes hatóanyag – felfedezését követően a transzplantációban immunszuppresszáns szerként törzskönyvezték (181). Célpontjának, az mTOR kináznak, majd daganatbiológiai szerepének megismerése után napjainkban már a harmadik generációs gátlók fejlesztése és tesztelése zajlik. Jelenleg nagy dózisban (5 mg/nap) alkalmazzák származékait tumor indikációs területeken: AML – temsirolimus; előrehaladott vese carcinoma, neuroendokrin tumorok: hasnyálmirigy-, emésztőrendszeri-, tüdődaganatok – everolimus. A rapamycin és származékai az mTOR kináz FRB doménjéhez kapcsolódó FKBP12 fehérjéhez kötnek az mTORC1 komplexben és gátolják a kináz aktivitását (122).

Az első generációs mTOR gátló származékokat a rapalógokat (1. táblázat.) – allosztérikus inhibitorok – napjainkban mono- vagy kombinációs terápiában is használják (temsirolimust pl. előrehaladott vesedaganatokban, everolimust pl. rekurrens ösztrogénreceptor pozitív ER+/HER2- emlődaganatoknál, egyes neuroendokrin és hasnyálmirigy tumoroknál) (182-184). A rapalógok klinikai vizsgálataiban azonban nem

mindig sikeresek, a ridaforolimusnál pl. elmaradtak a várt sikerek lágyrész sarcomákban (185). A legnagyobb probléma, hogy a rapalógok az mTORC2 komplexre nem vagy kevésbé hatnak és a jelátviteli hálózatban működő visszacsatolási mechanizmusok miatt, akár az mTORC2 aktiválódásához is vezethetnek. A második generációs mTOR inhibitorok már ATP-kompetitív gátlók, az mTORC1 és C2 komplexek hatásait egyaránt célozzák (1. táblázat) (186). A vistusertib tesztelése ennek ellenére sem hozott nagy sikert, bár még értékeli a fázis I és II tesztek eredményeit (187). Második generációs szerek közé soroljuk a dual inhibitorokat is, ezek az mTORC1 és mTORC2 mellett, a PI3K-t is gátolják; ebben a csoportban pl. NVP-BEZ235 fázisvizsgálatait nemrég állították meg. A második generációs mTOR gátlók közül eddig egyiket sem törzskönyvezték elsősorban a súlyos toxikus mellékhatások miatt (186).

Napjainkban a harmadik generációs mTOR gátlók vizsgálatai is folyamatban vannak, jelenleg a két korábbi inhibitor csoport tagjait és hatásait próbálják egyesíteni. A RapaLink-1 előnye a második generációs gátlókkal szemben pl., hogy rapalóg rezisztens mTOR kináz mutáns (mTOR^{R2505P}, mTOR^{S2115Y}) esetekben is hatásos (188). Igaz a RapaLink1-nél is felléphet az Akt útvonal feedback aktivációja, így Akt gátlókkal (pl. GDC-0068) kombinált alkalmazása is várható a jövőben (189).

Az mTOR gátlók önmagukban nem elég hatásosak, így alkalmazási területük különböző receptor tirozin kináz és más tumorokban hiperaktivált útvonalak gátlóinak kombinációjával várható. Több klinikai vizsgálatban tesztelnek kombinációkat, pl. emlődaganatoknál trastuzumab (HER2+ ellenes terápiát) mTOR kombinált (pl. everolimus, ridaforolimus) kezeléseket (190), a törzskönyvezett aromataz inhibitor kombináció mellett (183, 191). A temsirolimus kombinációkat egyéb szolid tumorok kezelésében is vizsgálják több, kevesebb sikerrel pl. c-Met inhibitorral (192), VEGF gátlókkal (193) vagy hagyományos kemoterápiás szerekkel. Tripla negatív emlődaganatokban pl. az everolimus carboplatin/vinorelbine-nel kombinálva hatásosnak bizonyult (194, 195), de paclitaxel/ciszplatinnal már nem (196, 197). Doxorubicin kombinációk meglepően jó eredményeket mutattak lágyrész sarcomákban (198) és ALL-ben (199). Az everolimust sikeresen kombinálták több esetben is a pirimidin analóg 5-fluorouracillal emlő- és más szolid daganatok esetében (200). Olyan preklinikai vizsgálatok is kezdődtek, ahol az aminosavak szintézisét vagy a zsírsavsintézist támadják mTOR gátlókkal kombinálva eddigi adatok szerint sikeresen

(201, 202). A II-es típusú cukorbetegség kezelésére használt metformin és az mTOR inhibitorok kombinációjával elkezdődtek a fázis I kísérletek (203). Illetve az mTOR gátlók és autofágia inhibitorok kombinációja is megjelenik a lehetséges kombinációk között és tesztelésük várható a jövőben (204). Az eddigi adatok szerint előbbi kombinációk a rezisztencia problémák áttörésében lehetnek sikeresek, de a mellékhatás profilok és az egyéni érzékenység is befolyásolhatja felhasználásukat a jövőben.

1. táblázat. Jelenleg toborzási periódusban lévő PI3K/Akt/mTOR útvonal gátló fázis kísérletek (forrás: <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>)

Gátlószer	Célpont	Fázis	Betegség
Rapamycin/Rapalogok	mTORC1/FKBP12	II	Előrehaladott szolid daganatok, hasnyálmirigy daganatok
		IV/II	Neuroendokrin/ szolid daganatok
		III	Rhabdomyosarcomák
		III	Szívbetegségek
ATP kompetitív mTOR kináz inhibitorok	mTOR kináz	I	Szolid tumorok, glioblastoma
		II	Szolid daganatok
		II	Pajzsmirigy-, fej-, nyak-, endokrin-, prosztata daganatok
		II	TNBC, vese, pajzsmirigy, stb.
		I/II	Lymphomák, tüdő/máj daganatok
PI3K/mTOR Dual inhibitorok	PI3K/mTOR	I/II	szolid/ emlő daganatok
		-	Emlő és prosztata daganatok
		II	Prosztata daganatok
Egyéb	Rictor	II	Non-Hodkin lymphoma
	mTOR/FKBP12		mTOR gátló rezisztens daganatok
	Akt	II	Gyomor, prosztata/emlő daganatok

1.3 A vizsgálatainkban tanulmányozott daganattípusok legfontosabb jellemzői

Vizsgálatainkban, terápiás, valamint mTOR hiperaktivitás szempontjából is jelentős, két tumortípussal: a magas malignitású, rossz prognózisú gliomákkal és az emlő adenocarcinomák eltérő molekuláris szubtypusaival foglalkoztunk. Modellrendszerként is glioma és emlőcarcinoma sejtvonalakkal dolgoztam. A két tumortípus fontosabb jellegzetességeit foglalom össze a következő fejezetekben.

1.3.1 A gliomák daganatbiológiai jellemzői

A központi idegrendszer rosszindulatú daganatainak legnagyobb csoportját felnőttkorban a gliomák alkotják, amelyek összefoglaló elnevezése gliális sejt eredetükre utal. A glia sejtek a neuronhálózatban az idegsejtek tápanyagellátásában vesznek részt, de támasztó- és vázfunkcióik sem elhanyagolhatók. A mielinhüvely alkotásában az oligodendrocyták, míg az elpusztult patogének és idegsejtek eltávolításában a microglia sejtek játszanak fontos szerepet. A gliomák morfológiai tulajdonságaik alapján is eltérnek, megkülönböztethetünk astrocytomákat, oligodendrogliomákat és ependyomákat (205). Ezek a daganatok malignitásukban is mutatnak eltéréseket, a lassan nöövő formák esetében a betegek túlélése jobb, az invazív típusok kezelése azonban óriási kihívást jelent.

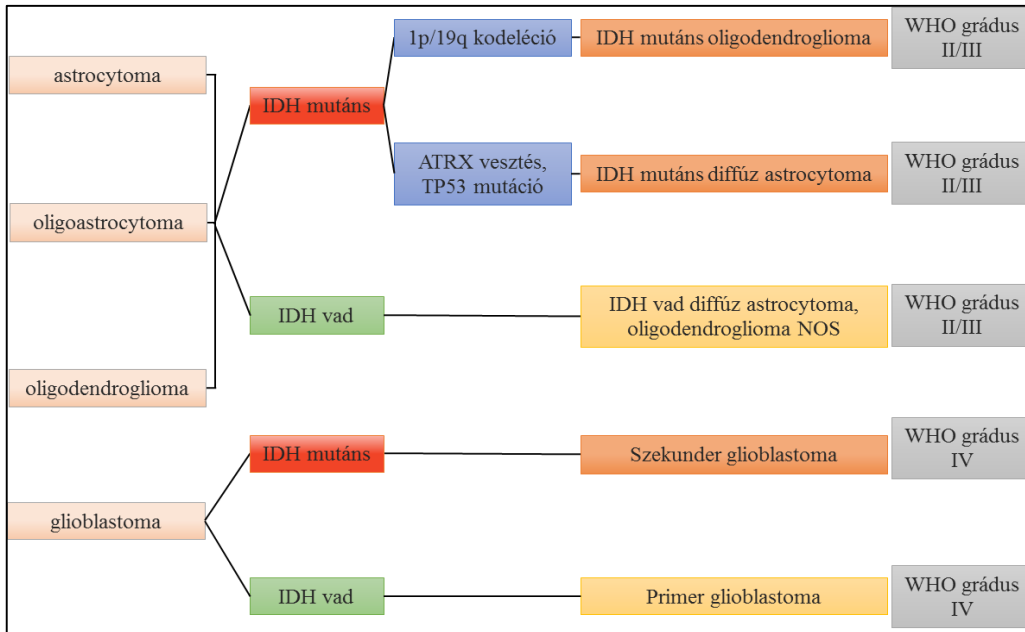
1.3.1.1 A gliomák osztályozása, klinikai jelentősége, kezelése

Az elmúlt időszakban a gliomák genetikai sajátosságait is egyre jobban megismertük. A felnőttkori gliomák 80%-át alkotják az elsősorban a nagyagyban (cerebrum) kialakuló astrocytomák. Megkülönböztetjük a grade I-es típusú jobban kezelhető, lassan nöövő formákat, amelyek felnőttekben alig fordulnak elő. A fiatalkori diffúz low grade (grade II) astrocytomák (oligodendrogliomás betegek túlélése akár 10-20 év is lehet) transzformálódhatnak magasabb malignitású formákba és ilyenkor az átlagos túlélés már jóval rövidebb. A grade III anaplasticus astrocytomák és a glioblastomák (grade IV) gyors, agresszív növekedésük miatt még nehezebben kezelhetőek. A grade IV glioblastoma multiforme a leggyakoribb elsődleges agytumor, rendkívül agresszív, igen

rövid túléléssel (átlagosan 15 hónap). Az előbbi csoportok molekuláris vizsgálatokkal további prognosztikai szempontból is fontos alcsoportra oszthatók (11. ábra) (205).

Több genetikai változást is leírtak a gliomákban. Az izocitrát-dehidrogenáz (*IDH*) gének funkcionyeréses mutációja grade II astrocytomákban és oligodendrogliomákban gyakran kimutatható. A mutáció fokozott 2-HG, onkometabolit termeléséhez vezet, ami epigenetikai és egyéb anyagcsere-változásokon – például a reaktív oxigéngyökök felhalmozódás, illetve a gének metilációs változása, pszeudohipoxiás hatások – keresztül segíti a daganatos progressziót. A mutáció – leggyakrabban az R132H *IDH1* mutáció – a gliomák kialakulásának korai szakaszában jelenik meg (206), a glioblastomák kisebb százalékát (kb. 10%), míg a low grade gliomák nagy százalékát (kb. 80%) jellemzi (207). Ez a mutáció a gliomák 2016-os osztályozásának fontos tényezője (205). A leggyakrabban előforduló rosszindulatú, agresszív agydaganatok a primer glioblastomák (gliomák 50%-a) esetében is fontos, mert jelenléte jobb prognózissal társul – a medián túlélés 13 hónapról 3-15 évre nő (208). Az eleinte jobb prognózisú *IDH* mutáns gliomákból a progresszió során azonban magasabb grádusú szekunder glioblastomák is kialakulhatnak, ezekben egyes jelátviteli útvonalak fokozott aktivitása (PI3K/Akt/mTOR) és bizonyos gének amplifikációja (*MYC*, *MET*, *EGFR*) is megjelenhet (209).

Az előbbi mutációk mellett megfigyelhető még a telomeráz enzim promotérének mutációja is egyes glioblastomákban és astrocytomákban. Előbbi az *IDH* mutációval nem (nagyon ritkán), leginkább funkcióvesztéses *ATRX* (kromoszómához kapcsolt α -talassémia/mentális retardáció) mutációval társulva fordul elő. Az *ATRX* a telomerázhosszabbítás mechanizmusainak gátlásáért felel. Gyakoriak még a p53 és RB gátlását eredményező, illetve az *EGFR* és más tirozinkináz-receptorok expresszióját fokozó mutációk is. Jellegzetes genetikai módosulás az oligodendrogliomákban az 1q és 19q kromoszómakarok kodeléciónja. Ennek a daganat szövettani morfológiájában és a terápiára adott válaszban lehet szerepe. A gliomák egyik sajátos formája a középvonalbeli glioma, ahol gyakran H3 hiszton pontmutáció figyelhető meg (205).



11. ábra. A gliomák osztályozása (205). Az IDH1 mutáció jelenléte vagy hiánya astrocytomák és oligodendrogliomák jelenlegi osztályozásának fontos eleme. Az *IDH* mutáns daganatok további jellemzője az 1p/19q kromoszómakarok kodelécioja vagy az ATRX (X-kromoszómához kapcsolt α -talasszémia/mentális retardáció) és a P53 mutáció is; (NOS: másképp nem csoportosítható)

Jelenleg a gliomák terápiajában a sebészi eltávolítás, sugár- és kemoterápia szerepel; a tumortípusa, kiterjedtsége határozza meg elsősorban a kezelési lehetőségeket. A műtét során fontos a tumor minél nagyobb részének eltávolítása, besugárzás esetén pedig a normál sejtek minél jobb állapotának megóvása sztereotaxiával. A kemoterápiában leggyakrabban guanin bázisú alkiláló szert, temozolomidot alkalmaznak (apoptózis indukáló hatása miatt), de néhány esetben procarbazin, ifosfamid és carmustin alkalmazására is sor kerülhet (205). A terápiai lehetőségek elég korlátozottak, az utóbbi évek fejlesztései (pl. bevacizumab és mTOR gátló fázisvizsgálatok) ellenére sincsenek igazi áttörések, az agresszív daganatok miatt a betegek rövid túlélése mindenképpen új targeteket és kezelési stratégiákat igényel.

1.3.2 A gliomák mTOR aktivitása és más anyagcsere változás jellemzői

A gliomákban más tumorokhoz hasonlóan megfigyelhető az mTOR hiperaktivitás, ez gyakran társul a PTEN, TSC2 és GATOR1 mutációval (210). Igazolható mTORC2 hiperaktiváció is, emellett mTORC2 mediált Myc overexpressziót, H3K56 promóter acetilációt (211), és az Akt túlműködését is leírták. Ezekkel a változásokkal együtt a gliomákban – mint metabolikus változást – fokozott aerob glikolízist is megfigyeltek. Az eddigi közlemények szerint az mTORC2 aktivitás gátlásával nemcsak az aerob glikolízis mértéke, hanem a vizsgált glioma sejtek α -KG szintje (Rictor KO kísérlet) is csökken (212). Ezek azt sugallják, hogy a Warburg-effektus mellett, a glutaminolízis is mTORC2-függő folyamat a gliomák anyagcseréjében. Az mTORC1/2 aktivitás a glikolízis és glutaminolízis szabályozásában is részt vesz, így fontos terápiás célpont lehet a gliomákban. Számos *in vitro* és *in vivo* kísérlet is bizonyítja a dual (213), a harmadik generációs mTOR inhibitorok, az mTORC2 összeszerelődését gátló kezelések (214) és a temozolomide kombinációk potenciális tumornövekedés gátló hatását IDH1 vad és mutáns glioma sejtekben.

Számos glikolízisben résztvevő enzim fokozott expresszióját (HK2, PFKP, PDK1, PKM2, stb.) leírták már glioblastomákban, de ezek közül eddig a PFKP és a PDK1 tűnnek a legígéretesebb célpontoknak (215). Korábban több fáziskísérlet is elindult a glükózanyagcsere gátlásával, ezek közül kezdetben a 2-DG ígéretes volt, azonban magas dózisu kezelés súlyos mellékhatásai miatt leállították a vizsgálatokat (216). A DCA és MCT gátlók is hasonlóan biztató eredményeket mutatnak preklinikai vizsgálatokban (217). A glioblastoma sejtek metabolikus plaszticitása (anyagcsere folyamat átrendeződési képessége), a glikolitikus folyamatok OXPHOS irányú átrendeződése azonban gátat szabhat a glikolízisgátlók hatásának. A glutaminhasznosítási útvonalak jelentősége és adaptációs szerepe még kevésbé feltárt. Ismert, hogy a glutamin TCA anaplerotikus útját gátolhatja az IDH1 mutáció, ami gyakori ebben a daganattípusban. Az IDH1 mutáció következménye, hogy α -KG-ból 2-HG keletkezik, ennek az onkometabolitnak keletkezése a glikolízisnek kedvez. A 2-HG epigenetikai hatásai, illetve az α -KG más irányú felhasználása az OXPHOS fenotípusnak, a mitokondriális folyamatoknak nem kedvez (218). A glutamin-glutamát- α -KG átalakulás, mint alternatív 2-HG szubsztrát útvonal működik, ezzel magyarázható a glutaminázgátlás IDH1 mutáns

sejtekben kimutatott növekedésgátló hatása. A glutaminhasznosítás több irányú felhasználási lehetősége glioma sejtekben glikolízis gátláskor vagy glükóz megvonáskor (éhezés esetén) vagy akár mTOR gátló alkalmazásakor a glutamin anaplerózis váltáson keresztül segítheti a sejtek alkalmazkodását, a rezisztencia kialakulását (219).

Ismert az is, hogy fokozott, az új sejtek keletkezését támogató *de novo* lipidszintézist mutatnak a gliomák (220). Ugyanakkor a glioma sejtek a mikrokörnyezetből exogén lipideket is képesek felvenni, lebontani és hasznosítani a mitokondriumban β -oxidációval (221). Nem szabad megfeledkezni más szénforrásokról sem, az acetát pl. daganatok esetében az ACSS2 expresszió támogatása mellett szintén hasznosítható szénforrás a sejtek számára. Irodalmi adatok szerint az ACSS2 expresszió fokozódása jellemző az agyi metasztatikus daganatokra és az agydaganatokra is (222). Összefoglalva, a gliomákban a glikolízis fokozott, a glioma sejtek azonban képesek glutamin-, zsírsavak- és acetátfelhasználásra is, ami nagyfokú metabolikus alkalmazkodó képességet (109) és további adaptációs mechanizmusokat (pl. autofágia) jelent. A kemoterápia rezisztens sejtek túlélését ezek összessége és változásaik is segítik, amit figyelembe kell venni a jövőbeni terápiás fejlesztésekben (223).

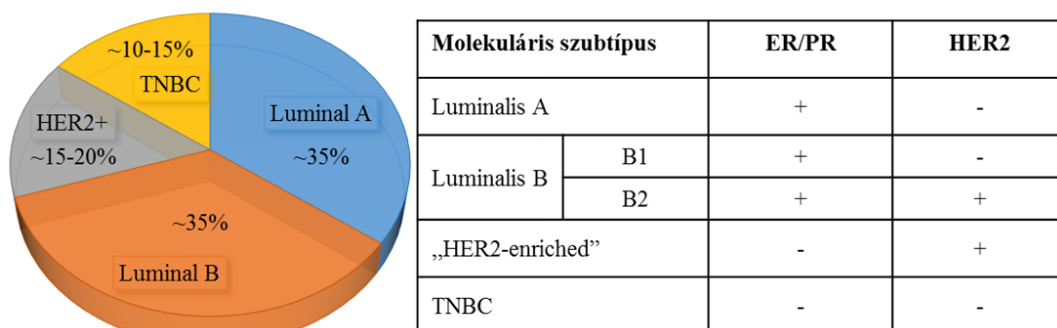
1.4 Az emlődaganatok daganatbiológiai jellemzői

Az emlődaganatok kezelése sokat változott és fejlődött az elmúlt években. A célzott hormonkezelések mellett, új támadáspontú kináz és immunellenőrzőpont-gátlók javítják az eredményeket – az utóbbi 30 évben az átlagos várható túlélés 20 hónappal, a teljes túlélés 15%-kal javult. A rossz prognózisú, terápiarezisztens emlődaganatok kezelése azonban további fejlesztéseket és erőfeszítéseket kíván, mivel az emlődaganatok előfordulása – ezen belül a fiatalkori emlődaganatok aránya – nem csökkent az elmúlt időszakban.

1.4.1 Az emlődaganatok osztályozása, jellegzetességei, kezelése

Malignus daganatok között második leggyakrabban előforduló daganattípus nőkben az emlődaganat. A statisztikák szerint a világ vezető országaiban 90 éves koráig minden nyolcadik nőt érint az emlőrák megjelenése, az esetek közel 95%-a pedig adenocarcinoma

(224). Klinikai szempontból a hormonreceptor (HR) expresszió – ösztrogén- (ER) és progeszteronreceptor (PR) – és a humán epidermális növekedési faktor receptor 2 (HER2) expresszió alapján terápiás és prognosztikai szempontból három fő csoport különböztethető meg: HR-pozitív (HER2-negatív, kb. 70%), HER2-pozitív (ER-negatív vagy pozitív 10-20%) és tripla negatív (ER-, PR-, HER2-negatív 10-20%) emlődaganatok csoportjai. A csoportokon belül további altípusokat lehet elkülöníteni, egyéb patológiai és áttétképző tulajdonságok alapján. Egy másik osztályozási rendszer négy fő molekuláris altípust különít el génexpressziós profil különbségek alapján. A négy fő csoport: luminális A (LumA), luminális B (LumB), HER2-pozitív (HER2+) és bazális típus. A LumA csoportba tartoznak az ER-pozitív, HER2-negatív alacsonyabb grádusú tumorok. A LumB tumorokra jellemző a magasabb grádus, HR-pozitív, viszont lehet HER2-pozitivitásuk is. A HER2-pozitív altípusba tartozó tumorok HR-negatívak, viszont a sejtekben HER2-overexpresszió figyelhető meg. A tripla negatív (TN) tumorok 95%-ában előforduló bazális típusú daganatokra az ER- és HER2-negativitás mellett a bazálisan elhelyezkedő myoepitelsejtekre hasonlító génexpressziós profil jellemző (12.ábra) (225).



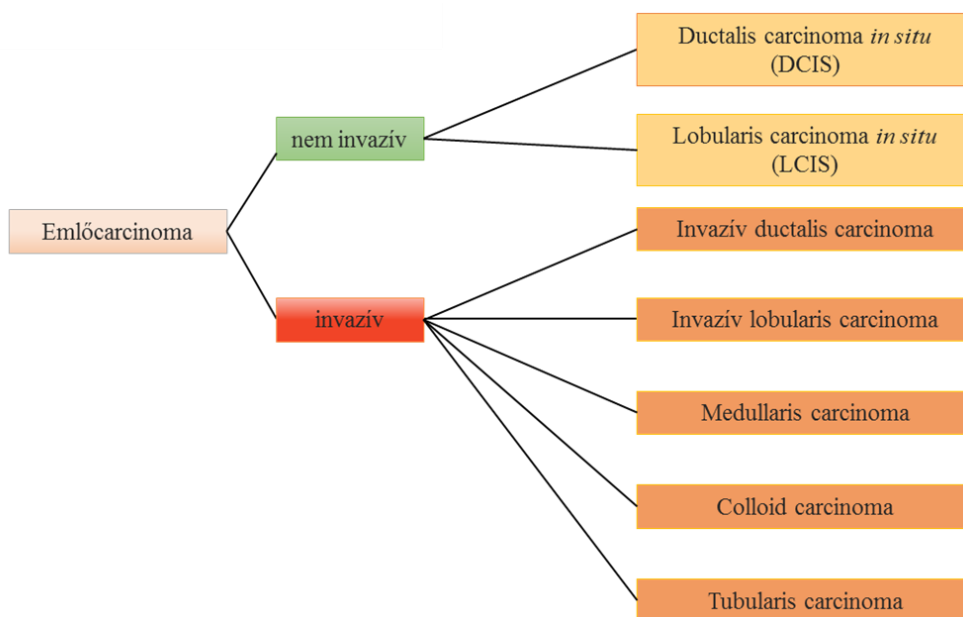
12. ábra Az emlődaganatok molekuláris osztályozása és a szubtípusok előfordulási gyakorisága ((225) alapján).

Az emlődaganatok kialakulását számos kockázati tényező befolyásolhatja. A 40 évnél fiatalabbak mindössze 5%-a érintett, míg ez a szám az 50 évnél idősebbek körében már 75% (226). Életmódbeli és reprodukciós különbségek is módosítják a gyakoriságot, kockázati tényezők pl. az elhízás, az alkoholfogyasztás vagy a különböző hormonpótló kezelések (ER-pozitív tumorok kialakulásának kockázatát növeli elsősorban). A kialakuló driver mutációk hatásaként egyes genetikai eltérések és hormonális tényezők is

szerepet játszhatnak a ductalis/lobularis epithelsejtek transzformációjában. Genetikai eltérések alapján veleszületett és szerzett mutációkat különböztethetünk meg. Az emlődaganatokkal összefüggésbe hozható főbb csírvonalbeli mutációk a genom stabilitását szabályozzák vagy a növekedési útvonalak irányításában szerepet játszó gének. A *BRCA1/2* a DNS-károsodás javításáért felelős, tipikus tumorszupresszor gének, mindkét allél inaktiválása vagy hibája szükséges a daganat kialakulásához. *BRCA1/2* mutációt hordozó nőkben 70 éves kor előtt szinte 100%-ban megjelenik a tumor, míg öröklődő mutációt nem hordozók esetében ennek esélye csak 12% (226). A *BRCA1* mutációk a TN, míg a *BRCA2* mutációk az ER-pozitív tumorokban jellemzőbbek. Egyéb öröklődő tumorszupresszor mutációk emlőcarcinomákban a *P53* és *PTEN* géneket érintik. A familiáris érintettségű gének közül több a sporadikus emlődaganatok kialakulásában is részt vehet. Az ER-pozitív és HER-pozitív daganatokban a *PI3K/Akt*, a TN és HER2+ tumorokban a *P53*, míg a tripla negatív emlőrákok 20%-ában a *BRCA1* gén szomatikus mutációi is szerepet játszanak az emlőcarcinomák kialakulásában (227). A kezelés szempontjából fontos genetikai változás a HER2 gén amplifikáció. A HER2 tirozin kináz-receptor a *PI3K/Akt* és Ras útvonalakkal áll kapcsolatban, serkenti a sejtek osztódását és gátolja az apoptózist. A HER2-t overexpresszáló daganatok célzott terápiája jelentős javulást hozott a betegek kezelésében, ez az altípus azonban a tumorsejtek magas osztódási rátája miatt még mindig rossz prognózisú. A hormonhatásoknak, elsősorban az ösztrogén, további fontos szerepe van a tumorok kialakulásában/progressziójában. A hormon receptorán (ER) keresztül, többek között fokozza a transzformáló növekedési faktor α (*TGF α*), a vérlemezke-eredetű növekedési faktor (*PDGF*) és a fibroblaszt növekedési faktor (*FGF*) termelését, amelyek segítik a tumor növekedését (226).

Az emlőtumorok patomorfológiai jellemzésében és klinikai viselkedésében fontos szempont a tumorsejtek és bazális membrán egymáshoz viszonyított elhelyezkedése (13. ábra). A bazális membránon belül maradó tumorok az *in situ* carcinomák, míg a membránt áttörőket az invazív carcinomáknak nevezzük. A non-invazív *in situ* carcinomák további két típusa: a ductalis (DCIS) és lobularis (LCIS) *in situ* carcinomák (225). Gyakran nekrozis és kalcifikáció jelenik meg a DCIS carcinomákban, ami felismerésüket segíti a mammográfiás vizsgálat során. Sebészi eltávolítással és radioterápia után ER-pozitív DCIS esetében anti-ösztrogén terápiát alkalmaznak (2. táblázat) (225). Előbbi kezelés mellett 97%-os hosszútávú túlélés érhető el, anti-ösztrogén

kezelés nélkül viszont az esetek harmadában kiújulhat és invazív carcinomává alakulhat a betegség. Az LCIS carcinomában nagyon ritkán alakul ki meszesedés, ezért gyakran csak akkor ismerik fel, amikor már invazív. Ilyen esetekben az ER-pozitív tumoroknál tamoxifen neoadjuváns kezelést követően klinikai és radiológiai utánekvetés vagy kétoldali mastectomia javasolt (225). Az invazív carcinomáknak – az emlődaganatok 70-80%-a ebbe csoportba tartozik – is több alcsoportját különböztetik meg. Túlnyomó többségük (50-65%) ER-pozitív, 15%-uk HER2-pozitív, míg 15% TN altípusba tartozik. Az emlődaganatok 10-15%-át alkotják az általában LCIS-hez társuló invazív lobularis carcinomák, amelyek többsége HR-pozitív (ritkán HER2-pozitív). Leginkább a csontvelőbe, ováriumokba, uterusba, májba és a központi idegrendszerbe adnak áttétet. A két leggyakoribb szövettani altípuson kívül 10% alatti gyakorisággal további ritkább szubtypusok is előfordulhatnak (226, 228).



13. ábra. Az emlődaganatok patomorfológiai csoportosítása ((225) alapján).

A szöveti differenciáció fokának (grade I-III) meghatározása alapján low-grade (grade I) és high-grade (grade III) elkülönítés elsősorban az osztódás, a tubulusképzés, a sejtmag mérete és alakja alapján történik. A primer emlőcarcinomák mérete fontos klinikai, prognosztikai tényező. Leggyakrabban 2-3 cm-es daganatok kerülnek felismerésre, ilyenkor a közeli nyirokcsomók a betegek felében érintettek (ezek ~20%-a *in situ* carcinoma) (225). Mivel azonban a molekuláris és morfológiai tulajdonságok, valamint a stádium is jelentősen befolyásolja a betegség kimenetelét a tumorok szövettani

megjelenése, proliferációs aktivitása, grade, hormonreceptor-expresszió, HER2-expresszió alapján történik a biológiai típus meghatározása. Az egyik legfontosabb prognosztikai szempontból a tumorstádium meghatározás (TNM): függ a tumor méretétől (T), a környező nyirokcsomók érintettségétől (N) és a távoli metasztázisok jelenlététől (M). A regionális nyirokcsomók érintettségét a sentinel (őrszem) nyirokcsomókban vizsgálják, nyirokcsomóáttét megléte, hiánya szintén fontos prognosztikai faktor, hasonló jelentősége van a távoli metasztázis meglétének vagy hiányának is, ami az esetek 5%-ban mutatható ki. A kórjóslat meghatározásában a Nottingham Prognosztikus Index szintén kiemelt fontosságú, meghatározása a tumorméret, a grade és az érintett nyirokcsomók száma alapján történik (229).

Az emlődaganatok onkoterápiája a sebészi, sugár- és gyógyszeres kezelés három pillérén alapul. A sebészi terápia tervezése a stádium ismeretében történik, az eltávolított emlőállomány mennyiségétől függően a lumpectomiától a radikális emlőeltávolításig terjedhet. Előbbihez gyakran társul a hónalji nyirokcsomók eltávolítása, ami érintheti az őrszem nyirokcsomót vagy akár a teljes axilláris nyirokcsomó blokkot is (230). Leggyakrabban emlőmegtartó műtétet követően, a helyi kiújulás megelőzése érdekében a műtėti felépülés után sugárkezelést, kemoterápiával is kiegészítve alkalmaznak. A sugár- és kemoterápia kombinációjának nemcsak a korai invazív emlődaganatok, hanem a lokoregionálisan előrehaladott tumorok és a távoli áttétek kezelésében is fontos szerepe van (230, 231).

Az emlődaganatok gyógyszeres kezelésében a hagyományos kemoterápiás készítményeken (pl. taxánok, antraciklinek) mellett a HER2-ellenes célzott kezelés és a hormonterápia kiemelt fontosságú. A gyógyszeres kezelés korai invazív emlődaganatok esetén (I, IIA stádium) adjuváns formában, míg lokoregionálisan előrehaladott betegség (IIb, III stádium) esetén primer szisztémás kezelés formájában javasolt. Az ún. „Allred score” alapján meghatározott hormonreceptor-pozitivitás, mely kombinálja a tumorsejt pozitívítás intenzitását és a pozitív tumorsejtek gyakoriságát, esetén hormonterápia alkalmazható: premenopausában elsősorban GnRH-analógokat (pl. goserelin) és antiösztrogén (tamoxifen) kezelést, postmenopausában aromatáz-gátlókat (pl. letrozol, ill. exemestan) adnak. HER2-amplifikáció jelenlétekor a kemoterápiás kezelés HER2-ellenes antitesttel (trastuzumab, ill. pertuzumab) egészíthető ki az adjuváns és neoadjuváns kezelés során egyaránt (231, 232).

Az utóbbi években a célzott terápiák között új irányok is megjelentek, amelyek elősorban az előrehaladott, távoli metasztázist adó emlődaganatok kezelését érintik (2. táblázat). Az FDA az utóbbi években hormonreceptor-pozitív, HER2-negatív daganatokban a CDK4/6 inhibitorokat (abemaciclib, palbociclib, ill. ribociclib), HER2-negatív daganatok esetén a PARP-gátlókat (olaparib, ill. talazoparib), HER2-pozitív daganatok esetén pedig a HER2 antitest-citotoxikus szer konjugátum trastuzumab-emtansine-t hagyta jóvá a terápiában (232). Az immunterápiás készítmények alkalmazása szintén egyre nagyobb teret nyer, az emlődaganatok kezelésében elsőként (2019 márciusában) az IMpassion130 vizsgálat eredményei alapján a PD-L1 gátló atezolizumab került elfogadásra kemoterápiával kombinációban, PD-L1-pozitív előrehaladott tripla negatív emlőcarcinomák terápiájában (233).

A korai felismerés jelentőségét kiemeli, hogy 95%-os 5 éves túlélés jellemző az *in situ* carcinomák 0. stádiumban felismert daganatok esetében. Az I-es stádiumú nyirokcsomó érintettség nélküli kisméretű tumoroknál a 10 éves túlélés ~86%, nagyobb (II-es stádium) nyirokcsomóáttétes esetekben ez már csak ~71%, míg előrehaladott III-as stádiumba sorolható eseteknél mindössze 54%. A IV-es stádiumba tartozó tumorok már távoli metasztázisokat képző daganatok, ahol a 15 éves túlélés mindössze 11% (234). A leggyakrabban metasztázis érintett szervek altípusonként változnak: a HR-pozitív esetek inkább a csontba, míg a HER2-pozitív és tripla negatív emlődaganatok az agyba adnak gyakrabban áttétet. A III-as és IV-es stádiumú emlődaganatos betegek szubtípusok szerinti 10 éves túlélésében kisebbek a különbségek (234). Az 5 éves túlélés ugyan az ER-pozitív csoportban kedvezőbb, mint az ER-negatív esetekben, de az ER-pozitív esetekben idővel terápia rezisztencia alakul ki, míg az ER-negatív kemoterápiára jól reagáló esetekben nagyobb az esély akár hosszabb túlélésre. Napjainkban a kezeléseknél köszönhetően az ER+/HER2- emlődaganatos betegek 80%-a túléli az első 5 éves periódust és HER2-pozitív emlődaganatos betegek kilátásai is sokat javultak a hatékonyabb és kevésbé toxikus mellékhatással járó célzott terápiáknak köszönhetően. Az elmúlt időszakban kerültek/kerülnek bevezetésre új immunellenőrzőpont-gátló kezelések, amelyek a rossz prognózisú tripla negatív emlődaganatos betegek túlélését is javíthatják a jövőben (226, 228). A cél újabb célzott terápiák fejlesztése, amelyek a PI3K/Akt jelátviteli útvonalak hiperaktivitására és pl. a BRCA mutáns daganatokra hatnak (226, 228).

2. Táblázat. Az emlődaganatok szisztémás terápiája ((232) alapján).

Stage		Ovárium szuppresszió	Endokrin terápia típusa és időtartama	Kemoterápia
Stage 1	T1ab	-	AI vagy tam (5 évig)	-
	T1c	-	AI vagy tam (5 évig)	Egyéni megfontolás alapján: tumorméret, N státusz, Altípus, LVI, grade, proliferáció, HR expresszió, stb.
Stage 2	Nyirokcsomó negatív	Igen és AI/tam, ha indokolt (tumorméret, kor <35, grade)	AI először Kiterjesztett terápia, 5 év tam után	
	Nyirokcsomó pozitív	Igen és AI/tam	AI alapú Kiterjesztett terápia	
Stage 3		Igen és AI/tam	AI alapú Kiterjesztett terápia	igen
Jelmagyarázat: AI: aromatáz inhibitor; tam: tamoxifen; LVI: lymphovaszkuláris invázió; HR: hormon receptor				
Stage		Tumor altípus kezelés szerint		
		HER2+	TNBC	
Stage 1 (általában adjuváns)	T1a	TH	Kemoterápia	
	T1b	TH	TC	
	T1c	TH	AC/T	
Stage 2 és 3 (elsősorban neoadjuváns)		AC TH (±P) vagy TCH (±P) vagy Nerstinib ER+/HER2+, N2 tumoroknál (-P)	AC/T ± platinum*	
Reziduális invazív tumor szisztémás kezelés után		Trastuzumab emtansine	capecitabine	
Jelmagyarázat: N2: 4+ pozitív nyirokcsomó; *: BRCA1/2 mutáció esetén adható; H: trastuzumab; P: pertuzumab; A: antraciklin kemoterápia; C: ciklofoszfamid kemoterápia; T: taxán kemoterápia				

1.4.2 Az emlődaganatok és metabolikus jellemzői

Diagnóziskor az emlődaganatok jellemzését és a terápiás döntések meghozatalát szöveti heterogenitásukat is tükröző több osztályozási rendszer segíti. A korábbi részben bemutatott legfontosabb csoportosítások elsősorban morfológia (pl. duktális, lobuláris, invazív vagy *in situ*), receptor kifejeződés/hiány (ösztrogén, progeszteron, HER2), illetve molekuláris sajátságokat (luminális-szerű, bazális-szerű, és alacsony kladinszintű) vesznek figyelembe. Az emlődaganatok anyagcsere-útvonalainak vizsgálata alapján is

megfigyelhetők altípusoktól függő és független jellegzetességek, de ezen eredmények rendszerezése és az emlődaganatok metabolikus szubtípusok szerinti osztályozása eddig még nem ismert. Elképzelhető, hogy az anyagcsereváltozások feltérképezése után az emlődaganatok metabolikus jellemzése is segíti majd új terápiás célpontok és protokollok kialakításában, a terápia hatékonyságának monitorozásában. A következőkben a leggyakoribb típusok ismertebb metabolikus jellemzőit foglaltam össze.

1.4.2.1 Hormonreceptor pozitív emlődaganatok metabolikus változásai

A diagnosztizált emlődaganatok 70%-a ER+ (235). Egyes adatok alapján az ER+ emlődaganatokban fontos szerepe van a metabolikus szimbiózisnak és a reverz Warburg-effektusnak (236). A tumorsejtek jelentős OXPHOS aktivitással jellemezhetők, környezetükből hasznosítják a stromális hipoxiás fibroblasztok általt termelt laktátot, ennek megfelelően van MCT1 és LDHB expressziójuk is (237). Más adatok szerint további metabolikus átrendeződések is megjelenhetnek a luminális daganatok egy részében. A vizsgálatokban leírt jelentős glutamináz, és glutation-szintáz (GS) mennyiség a glutaminhasznosításra és a redoxi egyensúly kiegyensúlyozottságára hívják fel a figyelmet (238, 239).

Gyakori, hogy az ER+ daganatos betegben endokrin terápia rezisztencia alakul ki. Az ER útvonal befolyásolhatja a glikolízist, a glutaminolízist és az OXPHOS-t szabályozó gének expresszióját (240, 241). Egyes metabolitok, mint a koleszterol is kapcsolatban állhat a tamoxifen rezisztencia kialakulásával (242), a mucin 1 transz-membrán glikoprotein mennyiség fokozódásának összefüggését mutatták ki a koleszterol és zsírsavanyagcserét befolyásoló/szabályozó gének expressziójának emelkedésével és a tamoxifen rezisztenciával kapcsolatban (243). Előbbiek mellett a nukleotidanyagcsere változásait is megfigyelték a tamoxifen rezisztenciával párhuzamosan. Ezek alapján a ribonukleotid reduktáz M2 (RRM2) szerepet játszhat az Akt indukált *in vitro* és *in vivo* tamoxifen rezisztencia kialakulásában is (244).

1.4.2.2 HER2+ és tripla negatív emlődaganatok metabolikus változásai

A HER2+ emlődaganatok általánosan jelentős, a TN emlőtumrok pedig a legmagasabb GLUT1 expresszióval rendelkező emlődaganatok, amivel párhuzamosan fokozott az LDHA és MCT1 expresszió is megfigelhető mindkét csoportban (245). A fokozott aerob glikolitikus aktivitást, a kialakuló Warburg fenotípust (háttérben c-MYC as EGFR expresszió fokozódásokat) az agresszivitással is összefüggésbe hozzák a legtöbb közleményben (246). Ez a magas glikolitikus, Warburg aktivitás megfigyelhető *in vitro* és *in vivo* modellekben is. Az emelkedett glükózfelvétel HER2+ daganatokban támogatja a zsírsavszintézist és ez az mTORC2-függő ATP-citrát-liáz aktivitással is összefüggésben lehet. A HER2+ tumorokra inkább a zsírsavak előállítása, míg a TN tumorokra a fokozott lipidfelvétel jellemző az eddigi eredmények szerint (247). Meglepő, hogy egyes közlemények a hosszú szénláncú zsírsavak mitokondriális transzportját biztosító CPT1A expresszió fokozódását és a zsírsavak oxidációs folyamatait, míg mások a zsírsavszintézissel összefüggő enzimek fokozott expresszióját hangsúlyozzák tripla negatív emlődaganatokban (248, 249). A HER2+ tumorokban magas glicin és alanin szintet és fokozott glutaminfelvételt írtak le (247). A HER2+ és tripla negatív emlődaganatokban is megfigyelhető c-Myc expresszió fokozódása, ami fokozza a glutamin transzportereket, a mitokondriális glutamináz expresszióját, segíti a glutation szintézist a sejtekben (250). A szöveti vizsgálatok az emlődaganatok glutamináz expressziójával kapcsolatban ellentmondásosak, nem lehet egyértelműen bizonyos altípusokhoz kötni a glutaminhasznosítást (239, 251).

1.4.2.3 Metabolikus gátlók az emlődaganatok kezelésében

Az emlődaganatokban antimetabolikus kezelések közé tartozhatnak egyes a nukleotidanyagcserét gátló kemoterápiás kezelések is (pl. 5-fluorocil, metotrexát), de azokat a kezeléseket tekintjük jelenleg metabolizmus gátló kezeléseknek, amelyek a sejtek bioenergetikai folyamatait, tápanyag- és energiaigényeinek kiszolgálását gátló hatásúak.

A jelenlegi terápiás kezelések közül az egyes célzott kezeléseknél ismertek a sejtek anyagcsere-változásait érintő hatásai. A trastuzumab kezelés csökkenti a glükózfelvételt

és a laktát leadást, a Warburg-effektus intenzitását (252), illetve a lapatinib, tirozin kináz gátló a GLUT1 és GLUT4 transzporterek kifejeződését. Ezek az aerob glikolízist gátló indirekt hatások összefüggenek a glikolízis gátlók (GLUT1 inhibitor, HK2 csendesítések vagy 3BP kezelések) esetében is megfigyelt *in vitro* emlőtumor növekedés gátló hatásokkal (253-255).

A glutamináz inhibitorok is csökkentik a tripla negatív sejtvonalak *in vitro* és *in vivo* növekedését és párhuzamosan csökkentik a glutation szintet (239). A glutamináz inhibitor érzékenység azonban elérhető, más bioenergetikai források pl. piruvát esetén felfüggeszthető, így a „metabolikus adaptációs mechanizmusok” jelentősen csökkenthetik hatását *in vivo* (87). Előbbihez hasonlóan más aminosavak, pl. a szerin bioszintézis gátlása is lehet a kemoterápia szenzitizálás eszköze egyes tripla negatív sejtvonalakban (256). Zsíranyagcsere gátlással (pl. FASN gátlás) eddig tumortípusfüggő és ellentmondó eredményeket közöltek. (257). A β -oxidáció gátlók sugárterápia rezisztens esetekben azonban nyújthatnak új lehetőségeket (258).

A metformin (2-es típusú diabétesz kezelése) összetett antimetabolikus hatásait számos szolid, így emlőtumorokban is tesztelik jelenleg (259). A metformin a mitokondriális elektron transzportlánc 1-es komplexének inhibitora, negatívan hat a daganatsejtek proliferációjára (260), de mitokondriális funkciókat gátló hatásuk miatt bizonyos antibiotikumok, így pl. a doxycycline off-target tumornövekedést csökkentő hatását is leírták már daganatokban. A doxycycline emlőtumorokban, egyes klinikai vizsgálatokban is mutat pozitív eredményeket (100).

A metabolikus gátlószer kezelések önmagukban nem, de a jelenlegi terápiák kiegészítéseként segíthetik a terápiás fejlesztéseket. A megfelelő kombinációk kialakításához a daganatok anyagcsere-folyamatainak megértéséhez azonban nemcsak az adott tumorszövetek metabolikus tulajdonságainak, hanem adott terápiás kezelések metabolikus hatásainak és a daganatszövet kompenzációs mechanizmusainak megismerése, jellemzése is szükséges.

2 Célkitűzések

Munkámban humán gliomák és emlő daganatok mTOR aktivitásának és metabolikus folyamatainak jellemzését, valamint glioma és emlőcarcinoma sejtvonalak mTOR gátlókkal és egyes metabolikus támadáspontú hatóanyagokkal szembeni érzékenységét vizsgáltam. Céljaim a következők voltak:

- I. Humán glioma szövetek és sejtvonalak vizsgálata:
 1. Humán gliomás esetek biopsziás mintáiban jellemezni az mTOR aktivitás és egyes metabolikus enzimfehérjék mennyiségi változásait
 2. IDH1 vad és mutáns glioma sejtvonalakban hasonló fehérje expresszió jellemzés, és az intracelluláris metabolit koncentráció különbségek vizsgálata.
 3. Az mTOR aktivitási és metabolikus jellemzők összehasonlítása a sejtvonalak mTOR inhibitor, temozolomide és metabolikus gátlószer érzékenységével.
 4. mTOR gátlók, más anyagcsere gátló kezelések, illetve temozolomide kombinációs kezelések *in vitro* hatásának vizsgálata glioma sejtekben

- II. Humán emlődaganat szövetek és sejtvonalak vizsgálata:
 1. Különböző szubtípusú humán emlődaganat sejtvonalak mTOR aktivitásának, metabolikus fehérje expresszió és intracelluláris metabolit koncentráció különbségeinek jellemzése. Előbbiek összehasonlítása az emlődaganat sejtvonalak *in vitro* mTOR inhibitor és metabolikus gátlószer érzékenységével.
 2. Az előbbi vizsgálatokra alapozva megfelelő immunhisztokémiai markerek kiválasztása klinikai szövetminták metabolikus és mTOR aktivitás jellemzéséhez emlődaganatok esetében. mTOR aktivitás és metabolikus jellemzése a különböző emlődaganat szubtípusokat reprezentáló szövetminták segítségével.
 3. A kapott szöveti jellemzők és a betegek klinikopatológiai adatainak összehasonlítása statisztikai módszerekkel.
 4. Emlődaganat modellekben mTOR és metabolikus gátlószer kombinációk hatásának vizsgálata *in vitro* és *in vivo*.

3 Anyagok és Módszerek

3.1 Tumor modellek

3.1.1 Sejt- és szövettanyésztés, *in vitro* vizsgálatok

Vizsgálatainkban humán sejtvonalkat használtuk: *IDH1* vad U87 MG, U373-U MG, U251 MG és *IDH1* mutáns U251 MG humán high grade glioma sejtvonalk; MCF7, T47D (LumA); ZR75.1, BT474 (LumB); SKBR3, MDA-MB453 (HER2+); ill. MDA-MB231, MDA-MB468, BT549, HS578T (TN) emlő adenocarcinoma sejtvonalk. Az *IDH1* vad és mutáns sejtvonalpárt Dr. William Leenders-től (Radboud University Medical Center, Nijmegen, Hollandia) kaptuk, a többi sejtvonalk az American Type Culture Collection (ATCC) sejtbankból származik. A sejteket 37°C-on, 5% CO₂ koncentráció mellett tartottuk. A sejtvonalkat RPMI 1640/DMEM high glucose/DMEM low glucose médiumban (Biotech), 10% főtális borjúsavó (hő inaktivált FBS, Biotech), 2 mM L-glutamin (Biosera) és 3,125% gentamycin (Sandoz) vagy 100 IU/ml penicillin - 100 µg/ml streptomycin (Merck-Sigma Aldrich) antibiotikumok mellett tenyésztettük sejtípustól függően. A letapadó sejteket 3-5 naponta passzáltuk tipszin-EDTA segítségével/oldattal (Biotech). Az adott kísérlettől függően (inkubációs idő, sejtszám) T25-ös vagy T75-ös tenyésztőflaskát, valamint 6-, illetve 96-lyukú plate-eket használtunk. Az alkalmazott módszertől és sejtípustól függően 2,5x10³-10⁵ közötti sejtszámmal indítottuk a kísérleteket.

3.1.2 *In vitro* kezelések

Az mTOR aktivitás tumornövekedés gátló és egyéb hatásait többféle mTOR útvonal gátlóval (mTORC1 gátló rapamycin – Rapa– Merck-Sigma Aldrich – 50 ng/ml; Akt és mTOR kináz gátló NVP-BEZ235 – BEZ – Cayman Chemical – 1 µM; mTORC1 és mTORC2 komplex gátló PP242 – PP – Tocris – 1 µM; ill. Akt kináz gátló GDC0068 – GDC – Cayman Chemical – 1 µM) vizsgáltuk. Egyéb metabolikus folyamatok szerepét lipidanyagcsere (zsírsavszintézis gátló BMS-303141 – BMS – 10 µM, zsírsavoxidáció gátló etomoxir – Etom – 50 µM, glikolízis gátló 3-brómpiruvát – 3BP – 100 µM, glutaminolízis gátló bisz-2-(5-fenilacetoamid-1,3,4- tiadiazol-2-il)-etil szulfid – BPTES – 10 µM) kezelésekkel, illetve mitokondriális funkció gátló (doxycycline – Doxy – 10

μM) és autofágia gátló chloroquine kezeléssel – Chl – $50 \mu\text{M}$) teszteltük. Kemoterápiás szerként a glioma sejtvonalak esetében temozolomide-ot – TMZ – $100 \mu\text{M}$), míg az emlőcarcinoma sejtek vizsgálatában doxorubicint (Doxo – 50 ng/ml) használtunk. A rapamycin az mTORC1-et, a BEZ a PI3K/mTOR-t, míg a PP az mTORC1/mTORC2-t gátolja. Az alkalmazott gátlószer-koncentrációkat a munkacsoport előző eredményei alapján választottuk ki. Kontroll kezelésekben a hatóanyagok oldószereinek (pl. DMSO) megfelelő mennyiségeit alkalmaztuk. A kezeléseket a sejtek letapadását követően (24 h inkubáció), médiumcsere és kezelőszer hozzáadása után általában 72 óráig végeztük (amennyiben ezektől eltérően jártunk el, azt külön jelöltük). A különféle gátlószerkombinációk additív vagy szinergista hatásainak elemzésére kombinációs indexet (CI) használtunk. A CI-t $(EA+EB)/EAB$ -ként számoltuk, ahol az EA és az EB a monoterápia egyedi hatása, az EAB pedig a megfigyelt kombinációs hatás. Amennyiben a CI értéke 0 és 1 közötti értéket vett fel akkor nem volt hatása. Abban az esetben, ha CI értéke 1 akkor additív, míg 1 feletti érték esetén szinergikusnak tekintettük a kombinációk hatását (261). Ahol a reagenseknél jelzés nem szerepel, azokat a Merk-Sigma Aldrich cégtől szereztük be.

3.1.3 *In vitro* proliferációs vizsgálatok

A sejt kultúrák proliferációjának Alamar Blue (AB, Thermo Fisher Scientific) vagy szulforodamine B (SRB) tesztet alkalmaztunk 96-lyukú plate-en. Az AB-t a kezelés utolsó 4 órájában adtuk a sejtekhez $10 \mu\text{g/ml}$ végső koncentrációban; a fluoreszcenciát Fluoroskan Ascent FL fluoriméterrel (Labsystems International; Ascent software) mértük $570\text{-}590 \text{ nm}$ -en. Az SRB teszt lépései: 1 órás 10%-os triklór-ecetsavas inkubálás 4°C -on, majd $0,4 \text{ m/V}\%$ SRB inkubálás 15 percig, ezt követően 10 mM -os Tris-bázis hozzáadása a fehérje-festék kioldásához. Az abszorbanciát 570 nm -en mértük Multiskan MS mikroplate leolvasóval (Labsystems International; Transmit software). Mindegyik kezelésnél legalább három független kísérletet végeztünk el legalább hat párhuzamossal. A proliferáció százalékos arányát a kontroll mintákhoz viszonyítva, annak %-ában adtuk meg.

3.1.4 Xenograft modell létrehozása ZR75.1 humán emlő carcinoma sejtekkel – *in vivo* vizsgálatok

A xenograft tumormodellt állatházi dolgozók segítségével súlyos kombinált immunhiányos (SCID) egerekben hoztuk létre. A ZR75.1 sejteket 8-10 hetes, 20-23 g tömegű SCID egerek emlő régiójába injektáltuk ($2,5 \times 10^6$) szubkután. Amikor a daganatok tapinthatók voltak (kb. 1 hónap), az állatokat kontroll, Rapamune-, doxorubicin- és doxycycline-monoterápiás, Rapamune+doxorubicin és Rapamune+doxycycline kombinációs csoportokra osztottuk (n=5 mindegyik csoportban). A kontroll csoportot fiziológiás sóoldattal kezeltük. A Rapamune-t (1 mg/ml, Wyeth Europa Ltd., 3 mg/testtömeg kg, *per os*) és a doxycycline-t (200 mg/testtömeg kg, intravénásan) hetente háromszor, míg a doxorubicint (2 mg/ml, TEVA – 2 mg/testtömeg kg, intravénásan) heti egyszer adtuk három héten át. A testtömeget és a tumor méretét minden héten háromnaponta regisztráltuk. A kísérlet végén megmértük a tumorok tömegét. A tumortérfogat meghatározásához a következő képletet használtuk: $\pi/6 \times (2 \times \text{rövidebb átmérő} + \text{hosszabb átmérő})^3$. A tumorokat lefagyasztottuk, valamint formalinnal fixálást követően paraffinos szövetblokkokat készítettünk. Az *in vivo* kísérleteket az intézetünk állatházának hivatalos engedélyével végeztük, amelyet az etikai felülvizsgálati testület hagyott jóvá (PEI/001/2457-6/2015), (PEI/001/1733-2/2015).

3.2 Fehérjeszintű expressziós vizsgálatok

3.2.1 Humán gliomás és emlőcarcinomás biopsziás minták vizsgálata

Jól jellemzett izocitrát-dehidrogenáz (IDH) vad típusú (n=10), ill. IDH mutáns (n=8) humán glioblastoma és high grade astrocytoma biopsziás mintákat kerestünk az intézeti archivált anyagban. A betegeket a Klinikai Idegtudományi Országos Intézetben (Magyarország, Budapest) 2014. január 1. és 2015. december 31. között műtötték. Az *IDH* mutáció vizsgálat mellett 1p19 kópia szám emelkedést is vizsgáltuk, két esetben 1p19q triszómiát, ill. tetraszómiát állapítottunk meg. Vizsgálatainkban kontroll szövetként peritumorális agyszöveti blokkokat használtunk (n=4). Az összes esetet az intézet patológusai felülvizsgálták és újra osztályozták az Egészségügyi Világszervezet 2016. évi központi idegrendszeri daganatok besorolása (205) alapján.

Klinikailag hosszú ideje követett 20-20 és LumA, LumB, HER2+, ill. tripla negatív emlőcarcinomás eset blokkjait, illetve normál emlőszöveteket (n=4), valamint a daganatok elérhető klinikai adatait gyűjtöttük össze immunhisztokémiai (IHC) vizsgálatainkhoz. A tumortípusokat a 2013-as St.-Gallen-i Konszenzus ajánlása alapján határozták meg (262). A daganatokat és a normál szöveteket műtéti reszekcióval távolították el a Semmelweis Egyetem (Budapest, Magyarország) I. sz. Sebészeti Osztályán 1999. augusztus és 2019. december között. A patológiai analízist a Semmelweis Egyetem II. sz. Patológiai Intézetében végezték (Budapest, Magyarország). Az összes daganat primer lézió volt és egyetlen beteg sem kapott kezelést műtét előtt. A klinikopatológiai adatokat az orvosi nyilvántartásokból szereztük be. A távoli metasztázismentes túlélést (DMFS) az elsődleges emlőcarcinoma első diagnosztizálása és a távoli metasztázis megjelenésének időpontja között eltelt időt a klinikai adatokból állapítottuk meg, a teljes túlélést (OS) pedig a diagnózis és a Belügyminisztérium nyilvántartási lekérdezése napjáig (2019.11.25.) határoztuk meg. Az archivált szövetmintákat a Magyar Tudományos Tanács Országos Tudományos Kutatási Etikai Bizottságának jóváhagyásával használtuk (7/2006. Sz., 14383-2/2017/EKU).

3.2.2 Immunhisztokémiai reakciók humán tumorszövetek multiblokkjain

A gliomás szövetek immunhisztokémiai vizsgálatát szöveti multiblokk (TMA) metszeteken végeztük. Betegenként két mintát használtunk a TMA blokkok elkészítéséhez és a tumor heterogenitás miatt legalább két darab 2 mm átmérőjű szövethengert helyeztünk egy-egy esetből egy TMA blokkba. A reprezentatív területeket egy neuropatológussal jelöltük ki. A gyűjtött emlőcarcinomás esetekben teljes metszeteket használtunk fel.

Deparaffinálás után magas nyomású, nedves antigén feltárát végeztünk (0,1 M-os citrát-puffer, pH6.0, elektromos kukta 3 x 7 perc). A szobahőmérsékletű metszeteket a primer antitestekkel 90 percig, Novolink poszt-primer reagenssel 30 percig, utána NovoLink Polimerdetektáló rendszerrel szintén 30 percig inkubáltuk, végül a reakciót DAB-peroxidáz (Dako) kromogént-szubsztráttal tettük láthatóvá amit hematoxilinnal magfestéskövetett. 0–3+ skálát használtunk az immunreaktivitás szemikvantitatív elemzéséhez, amelyet két független patológus határozott meg (a Panoramic Viewer

software segítségével – 3D Histech) az alábbiak szerint: nincs festődés 0; gyenge 1+; köztes festődés 2+; ill. erős festődés 3+. A H („hisztó”)-score értékeket két független patológus adta meg 0 és 300 között, úgy, hogy a festési intenzitást (0-3 +) megszorozta a pozitív tumorsejtek intenzitásának százalékaival (0-100%) (263).

A két vizsgálat során a következő ellenanyagokat használtuk: p-mTOR(Ser2448) (1:100; #2976; Cell Signaling Technology – CST); p-S6 (Ser 235/236) (1:100; #2211; CST); Rictor (1:1000 A500-002A; Bethyl); p-Akt-(Ser473) (p-Akt, 1:100; #4060; CST), GLS (1:200 #156876; Abcam), LDHA (1:400 #8337; CST), CPT1A (1: 500 #128568; Abcam), FASN (1:100, #3180; CST), anti-acetil-koenzim A szintáz short-chain family member 2 (ACSS2; 1:100; #3658; CST).

3.2.3 Hagyományos és kapilláris Western blot (WES Simple) vizsgálatok

Az *in vitro* sejtvonalak fehérje expressziós vizsgálatához Western blot és WES Simple technikát is felhasználtunk. A Western blot analízisben a kísérletek után a letapadt sejteket 3x mostuk, majd még a tenyésztő flakákban lizáltuk (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 10mM NaF, 10% tömény glicerol, 1% NP40, 1% PMFS, 2% NaVO₄, 1% proteáz inhibitor koktél) A vizsgálatokban a sejtizátumok fehérjekoncentrációit Bradford reagenssel (Bio-Rad) határoztuk meg. A Western blot analízisben mintánként 20-40 µg fehérjét SDS-PAGE elektroforézissel választottunk el, majd nedves blottolással PVDF membránra (Bio-Rad) blottoltuk a fehérjéket. A membránokat inkubáltuk az elsődleges antitestekkel egy éjszakán át 4°C-on. Majd megfelelő mosások közbeiktatásával Vectastain Elite ABC Kit (Vector) másodlagos előhívó kitért és kemilumineszcens előhívást (Thermo Fisher Scientific, ECL Western blotting Substrate) alkalmaztunk C-digit (LI-COR) fotodokumentációs rendszerben. Minden membrán esetében az anti-β-aktinnal (1:5000, #A2228; Merck-Sigma Aldrich) – mint loading kontroll – is elvégeztük az elemzéseket. Az alábbi elsődleges antitesteket használtuk: anti-p-mTOR (Ser2448, 1:1000, #2971; CST), anti-p-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 (LDHA, 1:1000, #3582; CST), anti-glutamináz (GLS, 1:1000; #156876; Abcam), anti-GLUT1 (1:1000, #652; Abcam), anti-β-F1-ATP-ase (1:2000, #14370; Abcam), anti-GAPDH (1:2500, mca2427; Serotec),

anti-pan-Akt (1:1000, #2920; CST), anti-p-(Ser473)-Akt 1 (p-Akt, 1:2000, #4060; CST), anti-foszfofruktokináz-P (PFKP, 1:1000, #8164; Abcam), anti-hexokináz-2 (HK2, 1:1000, #2867; CST) anti-ASCT2 (1:2000, #A304-353A; Bethyl), anti-lactate dehydrogenase B (LDHB; 1:2000; #85319, Abcam) anti-carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A; 1:1000; #128568, Abcam), anti-fatty acid synthase (FASN; 1:1000; #3180, CST) anti-acyl-coenzyme A synthetase short-chain family member 2 (ACSS2; 1:1000; #3658, CST), anti-pyruvate dehydrogenase (PDH; 1:1000; #3205, CST), anti-p-ATP-citrát-liáz (p-Acly, 1:1000, CST, CST #4331) és anti-p-AMPK (Thr172) (1:1000, CST #2535).

A WES Simple analízist (WES System – ProteinSimple-Biotechnne 004–600) a gyártó utasításai szerint végeztük. A 12–230 kDa-os kapilláris modulokkal (ProteinSimple SM-W004), illetve anti-nyúl (ProteinSimple DM-001), anti-egér (ProteinSimple DM-002) vagy anti-egér-biotin-avidin-HRP-s előhívórendszerrel (#7076; CST) kombináltan alkalmaztunk az elsődleges antitestektől függően. Röviden: egyforma fehérjekoncentrációjú glioma és emlő sejtminiat (0,2 vagy 1 µg/µl az alkalmazott másodlagos antitesttől függően) fluoreszcens Master Mix-ben hígítottunk, majd 95°C-on 5 percig denaturáltuk a fehérjéket. A mintákat, a blokkoló reagenst (antitesthígító), az elsődleges és a másodlagos antitesteket, valamint a kemilumineszcens szubsztrátot a plate-re pipettáztuk. A WES alapértelmezett beállításai a következők voltak: elválasztás és bekötés 395 V-on 30 percig; blokkoló reagens 5 percig, elsődleges és másodlagos ellenanyagok egyaránt 30 percig; luminol/peroxid kemilumineszcens előhívás 15 percig (az antitestek expozíciós idejét 1 és 512 s között). Az elektroferogramokat ellenőriztük, majd az automatikus csúcsértékelést manuálisan korrigáltuk, ha szükséges volt. A következő elsődleges ellenanyagokat 1:50-es hígításban használtuk: anti-p-mTOR(Ser2448) (p-mTOR, #2971; CST), anti-p-Ser235/236-S6 (#4858; CST), anti-Rictor (#2140; CST), anti-Raptor (#89603; Novus), anti-laktát-dehidrogenáz A (LDHA, #3582; CST), anti-glutamináz (GLS, #156876; Abcam), anti-GAPDH (mca2427; Serotec), anti-p-(Ser473)-Akt (p-Akt, #4060; CST), anti-foszfofruktokináz-P (PFKP, #8164; Abcam), anti-karnitin-palmitoil-transzferáz 1A (CPT1A; #128568, Abcam), anti-fatty acid szintáz (FASN; #3180, CST) anti-acetil-koenzim A szintáz short-chain family member 2 (ACSS2; #3658, CST), anti-piruvát dehidrogenáz (PDH; #3205, CST), anti-p-ATP-citrát-liáz (p-Acly, #4331, CST), és anti-p-Thr172-AMPK (#2535, CST), anti-

citokrómm c oxidáz (COXIV, #4850, CST), és mikrotubulushoz társult fehérje 1A/1B-könnyűlánc 3 (LC3, 110–57179, Novus).

3.3 Metabolitok extrakciója és mennyiségi meghatározása tömegspektrometriával

Az intracelluláris metabolitokat – laktát (LAC), piruvát (PYR), citrát (CIT), α -ketoglutarát (α KG), szukcinát (SUC), fumarát (FUM), malát (MAL), glutamát (GLU), aszpartát (ASP) – néhány módosítással Szoboszlai és mtsai. közleménye alapján extraháltuk (264). A intermedier metabolitokat a sejtekből és a felülúszókból metanol-kloroform-víz (9:1:1) eleggyel extraháltuk, majd 4°C-on lecentrifugáltuk (15 000×g, 10 perc, 4°C). A mérésig a felülúszókat -80°C-on tároltuk. A laktát-, piruvát-, citrát-, α KG-, szukcinát-, fumarát-, malát-, glutamát- és aszpartát-koncentrációkat kalibrációs görbék segítségével határoztuk meg az analitikai minőségű standardok hígítási sorainak (0,5–50 μ M) mérését követően. A metabolitarányok kiszámításához az adott minták sejtszámára normalizálva ng/10⁶ sejt koncentrációban kerültek megadásra. A folyadék kromatográfia-tömegspektrometriás (LC–MS) mérést a Perkin-Elmer Flexar FX10 ultrateljesítményű folyadék-kromatográf segítségével végeztük, Sciex 5500 QTRAP tömegspektrométerrel kapcsolva. A kromatográfias elválasztást egy Phenomenex Luna Omega C18 oszlopon (100×2,1 mm, 1,6 μ m) végeztük (GenLab Ltd.). A mozgófázis vízből és 0,1% (v/v) hangyasavat tartalmazó metanoból állt. Az MS negatív elektropray ionizációs módban működött. A mérésekhez a következő beállításokat használtuk: állandó hőmérséklet: 300°C ionizációs feszültség: -4000 V, belépési potenciál: - 10V, zárógáz: 35 psi, gáz1: 35 psi, gáz2: 35 psi, CAD-gáz: közepes. A kvantitatív elemzések elvégzéséhez többszörös reakciófigyelő (MRM) módszert alkalmaztunk.

3.4 Metabolikus, illetve mTOR komplex fehérjék génexpressziójának és emlődaganatos betegek klinikai adatainak elemzése a KM-plotter adatbázis felhasználásával

A Kaplan-Meier Plotter adatbázis (KM-plotter; <http://www.kmplot.com>) segítségével vizsgáltuk meg az mTOR útvonal releváns fehérjéinek és a metabolikus útvonalak egyes enzimeinek mRNS-expressziós adatait, illetve a prognózis közötti összefüggést. Ez a nyílt

hozzáférésű online túlélést elemző adatbázis 3951 emlődaganatos beteg Affymetrix HGU133A és HGU133+2 microarray (Affymetrix, Santa Clara, CA) adatainak elemzését teszi lehetővé (265). Az adatbázis segítségével már a kimutatott mRNS expressziós különbségek prognosztikai értékélését lehet elvégezni, statisztikailag jól kezelhető esetszámmal. A Hazard Ratio-t a legjobb automatikusan kiválasztott cut-off értéknél meghatározva; és a p értéket a log-rank teszttel számítva R-nek ábrázoltuk.

3.5 Statisztikai analízis

Az IBM SPSS Statistics szoftvert (verzió: 22; SPSS Inc.) használtuk a statisztikai elemzések elvégzésére. Az átlagértékeket és az SD-t három független kísérletből számoltuk, legalább hat párhuzamos mellett, az alkalmazott *in vitro* vizsgálatoktól függően. Mann-Whitney U-tesztet, Fisher-tesztet, log-rank tesztet és Kaplan-Meier-görbe analízist használtunk az IHC fehérjemarkerek prognosztikai értékének (túléléssel való összefüggés összehasonlítás) vizsgálatához. A Hazard Ratio-t Cox regressziós próba segítségével számoltuk ki a vizsgált fehérje H-score értékek és egyéb tényezők többváltozós elemzésében. Student t-tesztet is használtuk a kezelések hatásainak statisztikai számításaihoz. A $p \leq 0,05$ -öt tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

4 Eredmények

4.1 Humán gliomák vizsgálatának eredményei

4.1.1 mTOR jelátviteli útvonal aktivitásával összefüggő fehérjék és metabolikus enzimek expressziója humán gliomákban

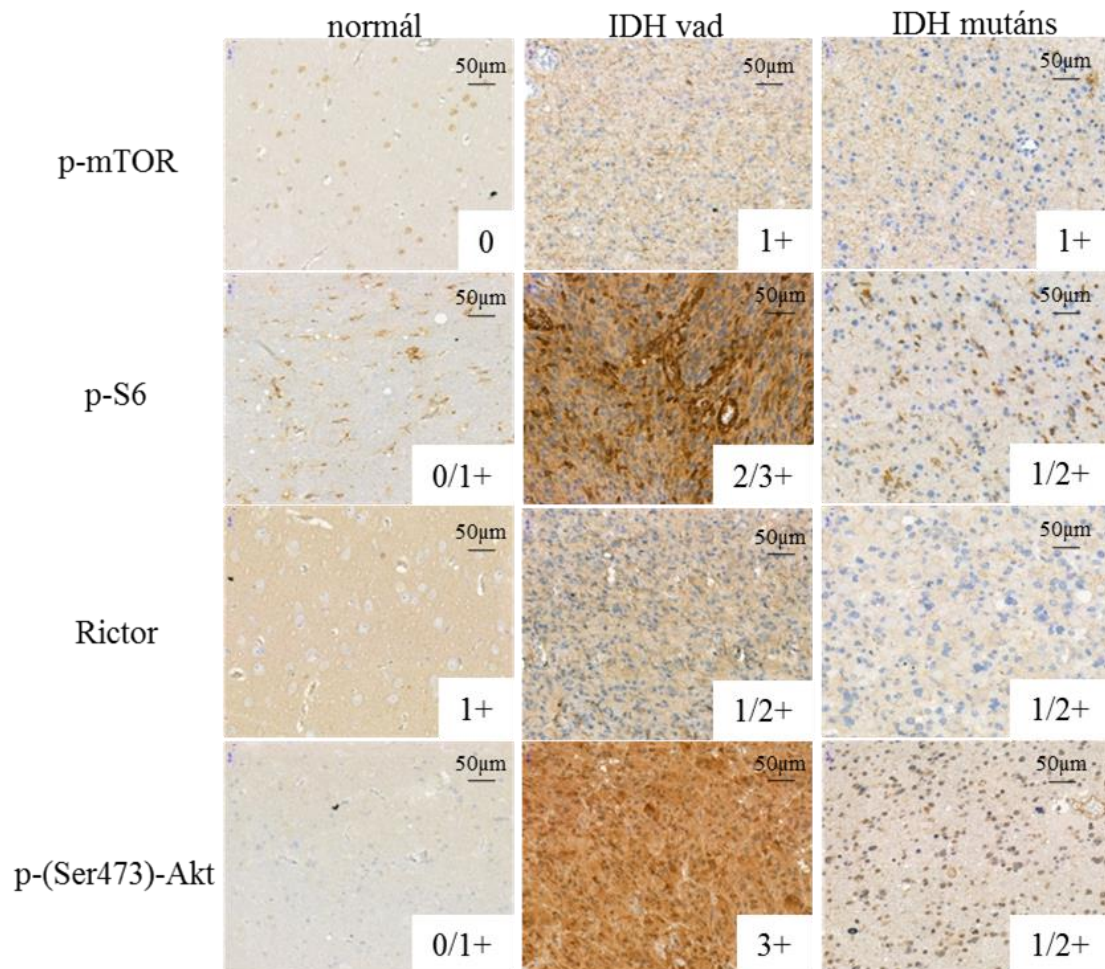
PhD munkám elején a labor glioma (IDH mutáns és vad), illetve IDH mutáns fibrosarcoma sejtvonalalal végzett vizsgálataiban az IDH mutáció meglétével és hiányával összefüggő jelentős bioenergetikai különbségeket figyeltünk meg: a. Warburg-effektus intenzitás, acetáthasznosítás és oxidatív foszforiláció aktivitás különbségei, b. glutamin, illetve a GABA, mint bioenergetikai szubsztrát potenciális jelentősége IDH vad gliomákban. c. mTOR aktivitás szerepe gliomák onkometabolit (laktát és 2-HG) termelésében (Hujber Zoltán Ph.D. disszertációjában bemutatott társszerzős cikkek).

Saját munkámban előbbieket folytatásaként mTOR és metabolikus aktivitással összefüggő fehérjék *in situ* fehérje expresszió különbségeit hasonlítottam össze normál peritumorális cerebrumban (n=4), illetve IDH vad és mutáns humán glioma mintákban (n=10 és n=8). Az immunhisztokémiai reakciók egyrészt fokozott mTOR, másrészt ezzel összefüggésben és a normál agyszöveténél magasabb metabolikus aktivitást mutattak (14-15. ábra). A normál agyszövet, p-mTOR, p-S6, Rictor és p-(Ser473)-Akt reakciókkal jellemzett alacsony mTOR aktivitásával szemben az IDH mutáns gliomákban közepesen emelkedett, míg az IDH vad típusú gliomákban még jelentősebb p-mTOR, p-S6 és (p-Ser473)-Akt fehérjemennyiség emelkedést figyeltünk meg. Ezek az eredmények, a más tumorokban is gyakran megfigyelt, rosszabb prognózissal összefüggő mTORC2 aktivitás emelkedésre utalnak (14. ábra).

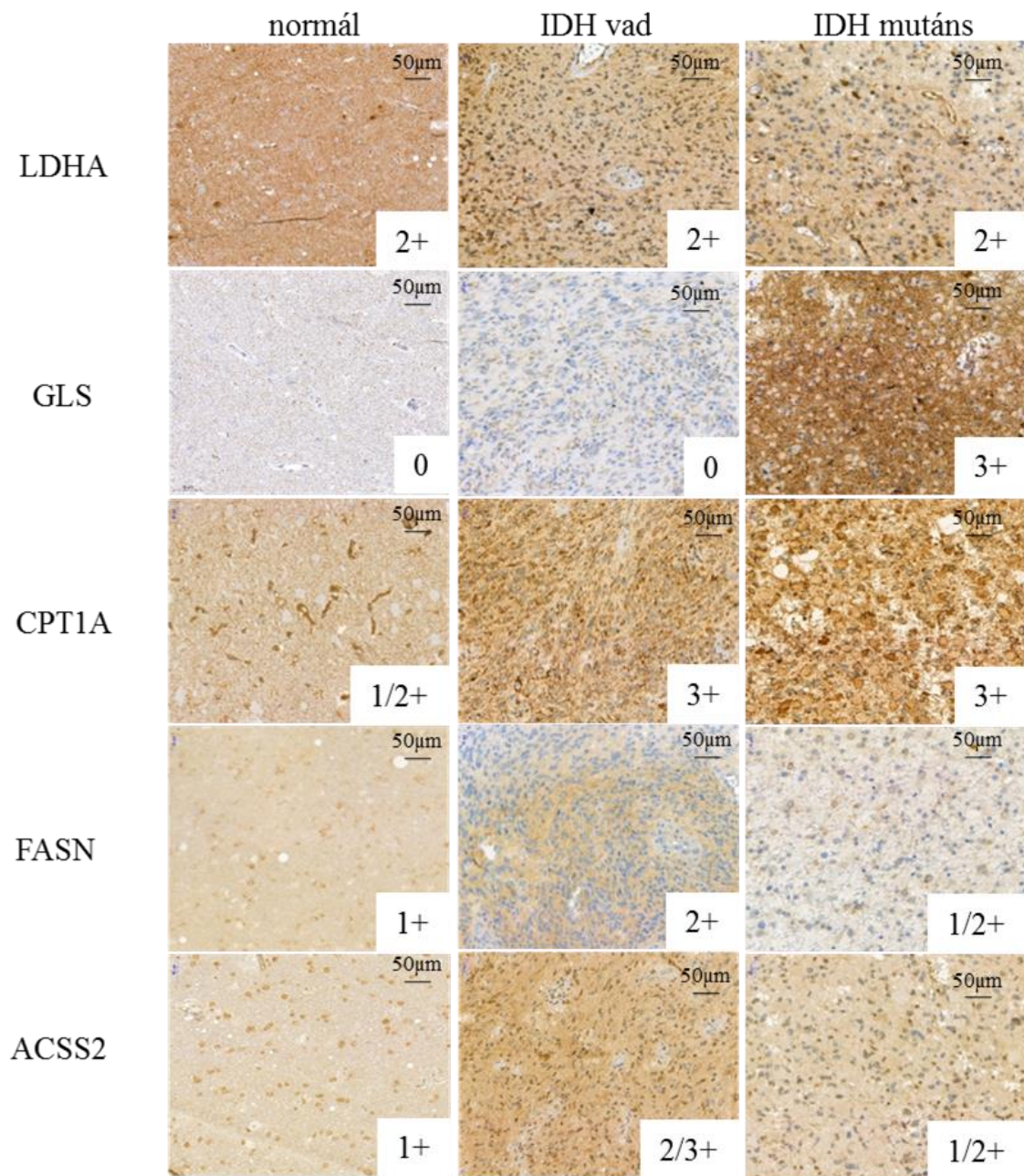
Metabolikusan a normál agyszövethez hasonló, az intenzív Warburg glikolízisre utaló egyformán magas LDHA expresszió jellemezte a gliomákat. A zsírsavszintézis FASN enzimének expressziója lényeges különbséget nem, a lipioxidáció szubsztrátjainak mitokondriális mátrixtranszportjában fontos szerepet játszó CPT1A és az acetát hasznosítással összefüggő ACSS2 mennyisége azonban jelentős emelkedést mutatott mindkét glioma típusban. Az IDH vad típusú gliomákat – a GLS expresszió kivételével – kifejezetten magas általános metabolikus enzimexpresszió jellemezte, ami szubsztrát felhasználásuk sokoldalúságára utal. Az IDH mutáns gliomákra ez kevésbé volt jellemző, a vizsgált 8-ból 6 esetben azonban a normál agyszövethez és a vad típusú

gliomákhoz képest is jelentősen emelkedett, karakterisztikus 2/3+ intenzitású GLS expressziót mutattunk ki.

Az IDH mutáción kívül más klinikopatológiai paraméterrel összefüggő expresszió különbséget az alacsony esetszámok miatt sem találtunk, igaz a p-(Ser473)-Akt mennyisége a grade IV glioblastomákban magasabb volt, mint a grade III anaplasztikus astrocytomákban. További szignifikáns összefüggést figyeltünk meg a Ki67 proliferációs index és a FASN expressziója között (Ki67<20% vs. Ki67 ≥20%, p = 0,001) (15. ábra).



14. ábra. mTOR aktivitás függő fehérjék reprezentatív IHC reakciói IDH vad típusú és mutáns humán gliomák metszetein a normál peritumorális cerebruméhoz hasonlítva. DAB kromogén (barna), hematoxin háttérfestés, a nagyítások a jobb felső sarokban, a metszetek digitalizálása után Panoramic Viewer programmal értékelve.



15. ábra. Metabolikus fehérjék IHC vizsgálatának reprezentatív reakciói humán peritumorális cerebrumban, IDH vad típusú és mutáns gliómákban. DAB kromogén (barna) mellett hematoxin háttérfestést alkalmaztunk, a nagyításokat feltüntettük, a metszeteket digitalizálása után Panoramic Viewer programmal értékeltük.

4.1.2 mTOR aktivitással összefüggő metabolikus különbségek, valamint temozolomide, illetve mTOR inhibitorok hatásának vizsgálata *in vitro* humán glioma sejtvonalakban

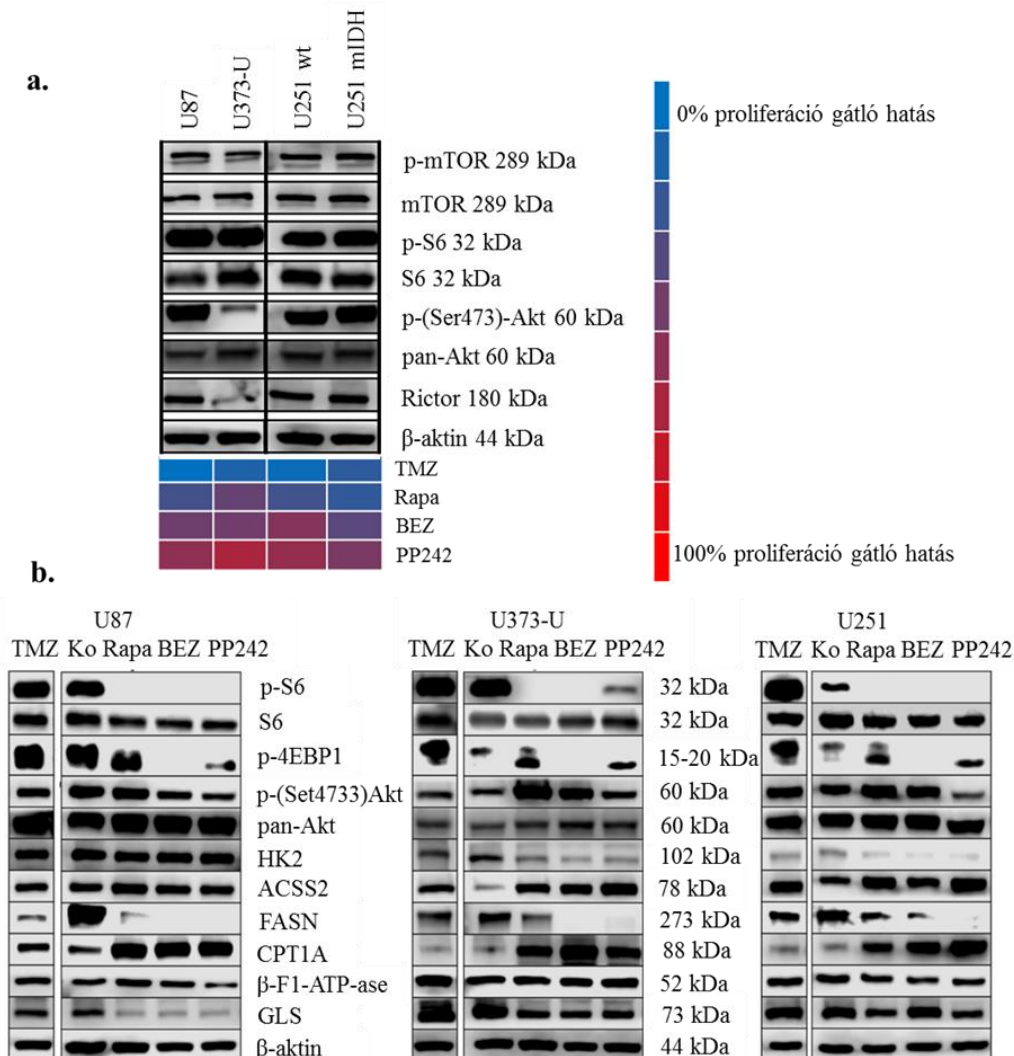
Az mTORC1 és mTORC2 aktivitással összefüggő fehérjék emelkedett expresszióját figyeltük meg mind a négy glioma sejtvonalban (16. ábra). Az U373-U alacsonyabb Rictor és p-(Ser473)-Akt mennyiséget mutatott, mint a többi vizsgált sejtvonal, ugyanakkor a p-S6 fehérje mennyisége ebben és az U87 sejtvonalban volt a legmagasabb.

A temozolomide – gliomák kemoterápiájában alkalmazott – kezelés *in vitro* nem mutatott szignifikáns anti-proliferatív hatást egyik vizsgált sejtvonalban sem, még az IDH mutáns glioma sejtekben sem. Az mTOR aktivitást jellemző fehérjék mennyiségével összefüggésben az mTORC1/C2 és dual mTOR inhibitorok szignifikánsan nagyobb proliferációgátlást mutattak, mint a rapamycin és a temozolomide. Az U373-U sejten megfigyelt alacsonyabb Rictor és p-(Ser473)-Akt mennyisége ellenére jelentősebb hatást tapasztaltunk a dual és a kombinált mTOR gátló kezelésekben. Az U87 és a genetikailag módosított IDH mutáns U251 sejtek bizonyultak a legkevésbé érzékenyek a temozolomide és mTORI kezelésekben.

Utóbbiak alapján a gliomák típusa szempontjából releváns, genetikailag nem módosított három sejtvonalban Western blottal vizsgáltuk az mTOR aktivitásával összefüggő és metabolikus enzim fehérjék mennyiségi változásait 72 órás temozolomide és mTORI kezelések után. A p-S6 fehérjék mennyiségét mindegyik mTOR inhibitor, a p-4EBP1 mennyiségét azonban csak a NVP-BEZ235 csökkentette. Az mTORC2 aktivitással összefüggő p-(Ser473)-Akt mennyiségének emelkedése valamennyi sejtvonalban jól mutatta a rapamycin gátló hatását, az S6K negatív feedback mechanizmusának hiányát. Ez a foszforilációs változás a dual, illetve az mTORC1/C2 gátló kezelésekben elmaradt. A temozolomide nem volt hatással sem az mTORC1, sem az mTORC2 aktivitására.

Az mTOR inhibitor kezelések más a metabolikus folyamatok aktivitásváltozását jellemző enzimek közül a HK2, FASN és a GLS (kivéve NVP-BEZ235 az U251-ben) mennyiségét csökkentették, míg párhuzamosan a CPT1A és ACSS2 expresszióját fokozták. Utóbbi változások mTOR gátlást követően jelentős metabolikus

átrendeződésekre, az oxidációs, a lipid és acetát szubsztrát felhasználási folyamatok intenzitás emelkedésére utalnak. A temozolomide metabolikus átrendeződést eredményező hatásai kevésbé voltak jellegzetesek és jelentősebb egyedi különbségeket mutattak a sejtekben. A FASN expressziót a temozolomide ugyan csökkentette, de párhuzamosan a CPT1A és a GLS mennyisége nem változott a kezelés hatására. Az ACSS2 és a HK2 expresszióváltozások mutatták leginkább az egyedi jellegzetességeket. Az ACSS2 expresszió emelkedett, míg a HK2 mennyisége csökkent temozolomide kezelést követően az U251-ben és U373-U-ban, de nem változott a harmadik sejtben.



16. ábra. mTOR aktivitás különbségek, ill. anyagcsere útvonalakkal kapcsolatos egyéb enzimek mennyiségének változásai mTORI (rapamycin – Rapa 50 ng/ml; NVP-BEZ235 – BEZ 1 μM; PP242 1 μM) és temozolomid (TMZ 100 μM) kezelések (72h) után U87, U373-U, U251 IDH vad és mutáns humán glioma sejtekben. a.

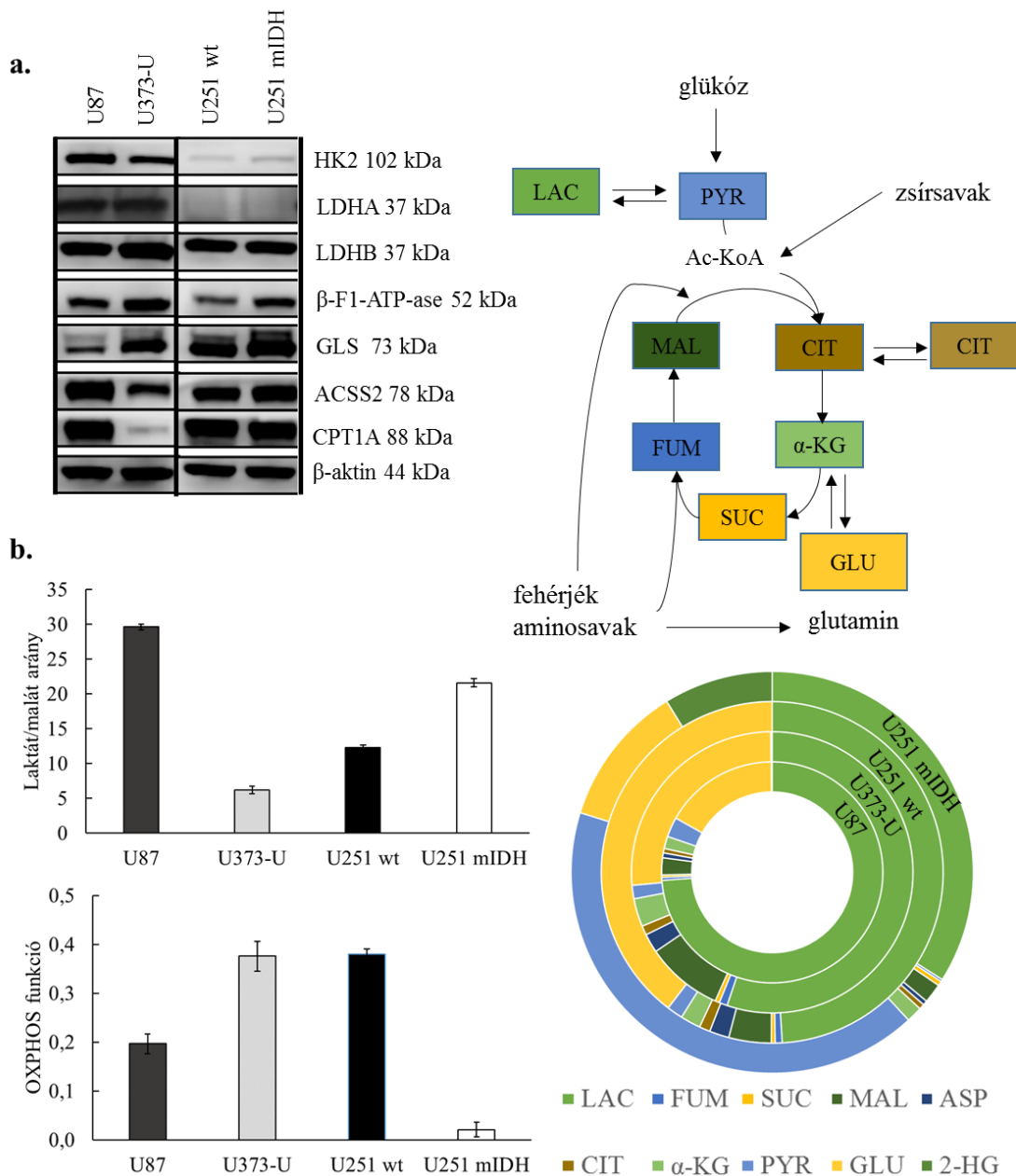
mTOR aktivitás különbségekre utaló fehérje expressziós mintázat reprezentatív Western blot képeken, ill. Alamar Blue és SRB tesztek alapján meghatározott (átlag) TMZ és mTORI érzékenységek bemutatása hőtésképen (piros – 100% gátlás szenzitív; kék 0% hatás - rezisztens). b. Az mTORC1 és C2 aktivitással kapcsolatos fehérjék és más metabolikus enzimek mennyiségének változása a kezeléseket követően (reprezentatív Western blot eredmények).

4.1.3 Metabolikus aktivitással összefüggő fehérje expresszió és metabolit különbségek, valamint metabolikus gátlószerek hatása glioma sejtvonalakban

A metabolikus fehérjék és a vizsgált intracelluláris metabolitok mennyiségi összehasonlítása további egyedi különbségeket mutatott, amikor a fehérje expressziós profilokat a 4 sejtvonalban vetettük össze. Az U251 vad és mutáns sejtvonalak alacsonyabb glikolitikus (HK2, LDHA) aktivitást és párhuzamosan magasabb GLS expressziót mutattak a másik két sejtvonalhoz képest. A reverz Warburg hatásra utaló LDHB mennyiségében nem volt szignifikáns különbség a sejtvonalak között, ez arra utal, hogy a glikolitikus fenotípus az LDHA és HK2 expresszió változással függhet inkább össze. Ha a három alap (nem módosított) sejtvonal GLS expresszióját vizsgáljuk, az mutatta a legegységibb különbségeket, legalacsonyabb expressziót az U87 sejtekben tapasztaltunk (17. ábra). Az U373-U sejtvonalban a zsírsavoxidációval és acetáthasznosítással összefüggő enzimek expressziója volt a legalacsonyabb, ami a csonka citrátkör és a glutaminolízis fokozott szerepére utal ebben a sejtben. Érdekes, hogy a vad és IDH mutáns fehérjét expresszáló U251 sejtvonalak között jelentős különbséget a metabolikus fehérjék expressziójában nem figyeltünk meg.

Az egyes metabolitok mennyiségét vizsgálva, a laktát/malát arány az U87 sejtekben volt a legmagasabb, ami összefügg a HK2 és LDHA mennyiségi különbségeivel. U373-U sejtvonalban hasonlóan magas glikolitikus enzim expresszió mellett, lényegesen alacsonyabb laktát/malát arányt tapasztaltunk, aminek hátterében a glutamin anaplerózis, a glutamin oxidáció, mint alternatív bioenergetikai folyamat állhat. Ezzel összefügghet a glutamát mennyiség fokozódása is, ami fokozott glutaminfüggőségre is utalhat ebben a sejtvonalban. Az IDH vad és mutáns sejtvonalak egymáshoz képest hasonlóan magas glikolitikus enzim expresszióval rendelkeznek

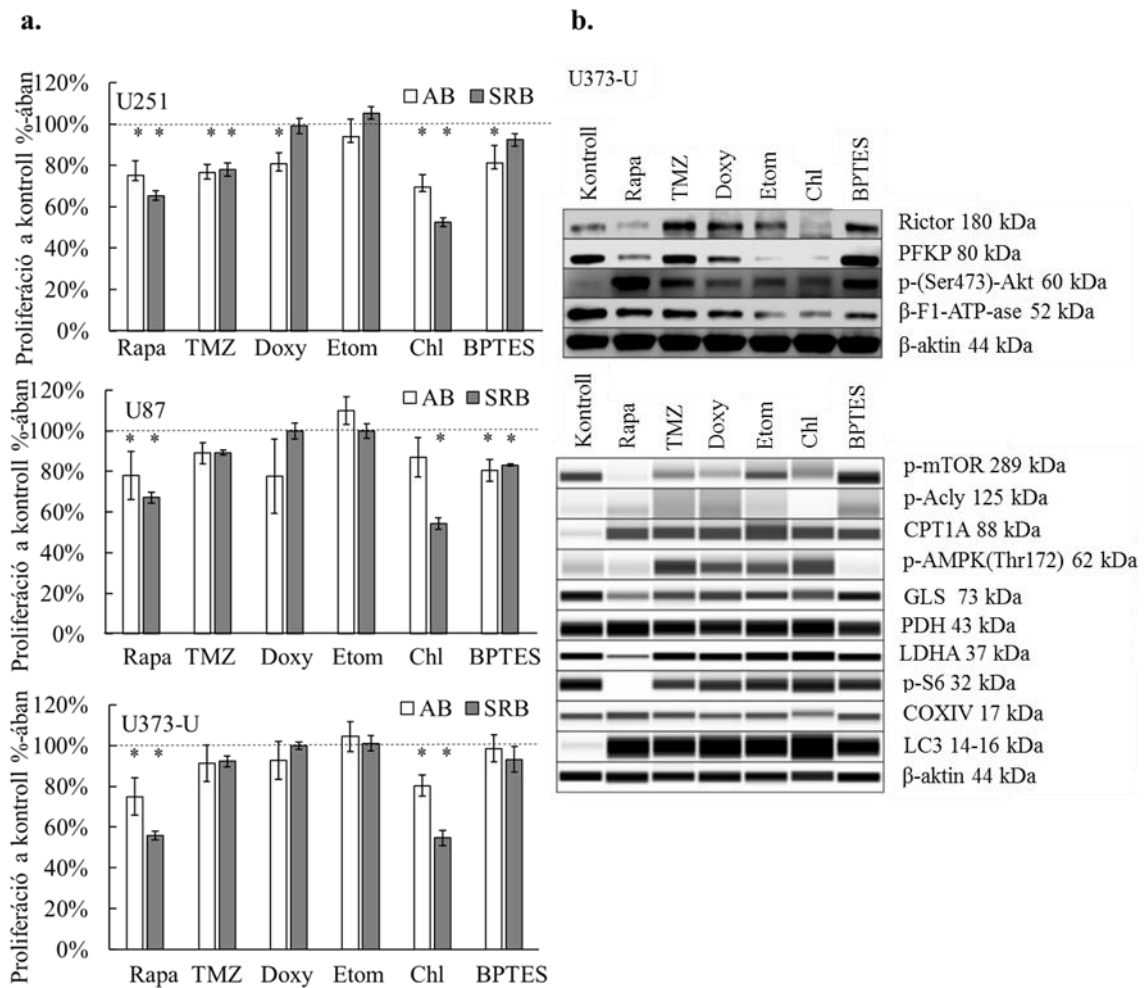
ugyan, de az IDH mutáció következményeként magas 2-HG onkometabolit szintet igazoltunk LC-MS-sel. Ez jelentősen módosította a metabolitok megoszlását és arányát a mutáns sejtvonalban. Az U251 mIDH sejtekben emelkedett piruvát szintet mutattunk ki az alap U251 sejtekhez képest az alacsony LDHA és legmagasabb GLS expresszió mellett. Ez a csökkent mitokondriális működésre és a metabolit-koncentráció arányokban is megjelenő alacsony OXPHOS kapacitásra hívja fel a figyelmet, amiben a glutaminforrású 2-HG onkometabolit szintnek is van szerepe. Azt, hogy az IDH mutáció kompenzálásában szerepe lehet a metabolikus átrendeződésnek, jól mutatja, hogy az alacsony LDHA szint ellenére a laktát termelés, a Warburg-effektus arányaiban emelkedik az alap U251 sejtvonalban tapasztalathoz képest.



17. ábra Metabolikus különbségek az U87, U373-U U251 IDH vad és mutáns humán glioma sejtekben. a. A vizsgált metabolikus enzimek mennyiségi különbségeinek bemutatása reprezentatív Western blot-on b. LC-MS-el mért intracelluláris metabolit koncentrációk jellegzeteségei a négy humán glioma sejtvonalban. A glikolitikus folyamatok jellemzésére a laktát/malát arányt, míg az OXPHOS funkció jellemzésére (citrát / szukcinát) / (fumarát / malát) arányokat használtuk. A jobb oldali kördiagram a mért metabolitok arányát az összes mért metabolitához viszonyítva mutatja (laktát-LAC, piruvát-PYR, citrát-CIT, α -ketoglutarát- α -KG, szukcinát-SUC, fumarát-FUM, malát-MAL, glutamát-GLU és 2-hidroxiglutarát-2-HG).

Mivel a három alap glioma sejtvonaltban jelentős metabolikus enzim expresszió különbségeket tapasztaltunk, ennek a három sejtvonaltnak vizsgáltuk metabolikus gátlószerekkel szembeni érzékenységét (18.a. ábra). A vizsgált glioma sejtek metabolikus adaptációs, alkalmazkodási képességeit jól mutatja, hogy jelentős mértékű proliferációgátló hatást gyakorlatilag egyik kezelés esetében sem tapasztaltunk sem Alamar Blue, sem SRB proliferációs teszttel. Az Alamar Blue és az SRB tesztek eltérő eredményei is arra utalnak, hogy Alamar Blue esetében a mitokondriális kompenzáció jelét és nem feltétlen proliferáció fokozódást figyeltünk meg. Mindezek alapján mindig érdemes összevetni a kapott egyéb eltérésekkel a proliferációs eredményeket és legalább két különböző típusú proliferációs teszt eredményét figyelembe venni szenzitivitás értékelésében. A GLS gátlás (BPTES), a zsírsavszintézis-gátlás (etomoxir) és a doxycycline kezelés után lényeges proliferációgátlást nem tudtunk kimutatni gyakorlatilag egyik sejt esetében sem. Érdekes, hogy az autofágia indukáló mTOR gátlók (rapamycin) és gátló (chloroquine) kezelések sejtvonalfüggő növekedés gátló hatásokat okoztak. Összeségében ez a két kezelés a leginkább az U373-U sejtek proliferációját gátolta. Ebben a sejtvonaltban megvizsgáltuk a különböző gátlószerek fehérje expressziókra gyakorolt hatásait is Western blot és WES technikával (18. a.b. ábra). A BPTES, a doxycycline és az etomoxir monoterápia kezelések sem proliferációs hatásokat sem jelentős fehérje vagy foszfo-protein expresszió változást nem mutattak. Az utóbbi két kezelésben csak az AMPK markáns aktivációját tapasztaltuk. A kemoterápiás temozolomide rezisztencia mellett szintén jelentős mértékben megmaradó mTORC1 aktivitást (enyhe p-mTOR és p-S6 expresszió csökkenés) és mTORC2 aktivitás eltolódást (fokozódó p-(Ser473)-Akt és Rictor expresszió), valamint CPT1A és LC3 expresszió fokozódást, lipolitikus metabolikus eltolódást figyeltünk meg. Ezek egymással összefüggő potenciális kompenzációs anyagcsereváltozásokat mutatnak. Rapamycin kezelést követően egyrészt a várt mTOR aktivitás csökkenést (p-S6 és p-mTOR), mTORC2 aktivációt és a temozolomide esetében is tapasztalt lipolitikus kompenzációs (CPT1A és LC3 expresszió emelkedés) hatásokat tapasztaltuk mérsékelt proliferációs hatások mellett. Egymással ebben az esetben is összefüggő metabolikus átrendeződést és enyhe, már szignifikáns proliferáció csökkenést mutattunk ki. A chloroquine monoterápiát ellentmondásos metabolikus változások jellemezték az U373-U sejteket. Így például, érintetlen glikolitikus enzim expresszió mellett mTORC1 aktivitás változás

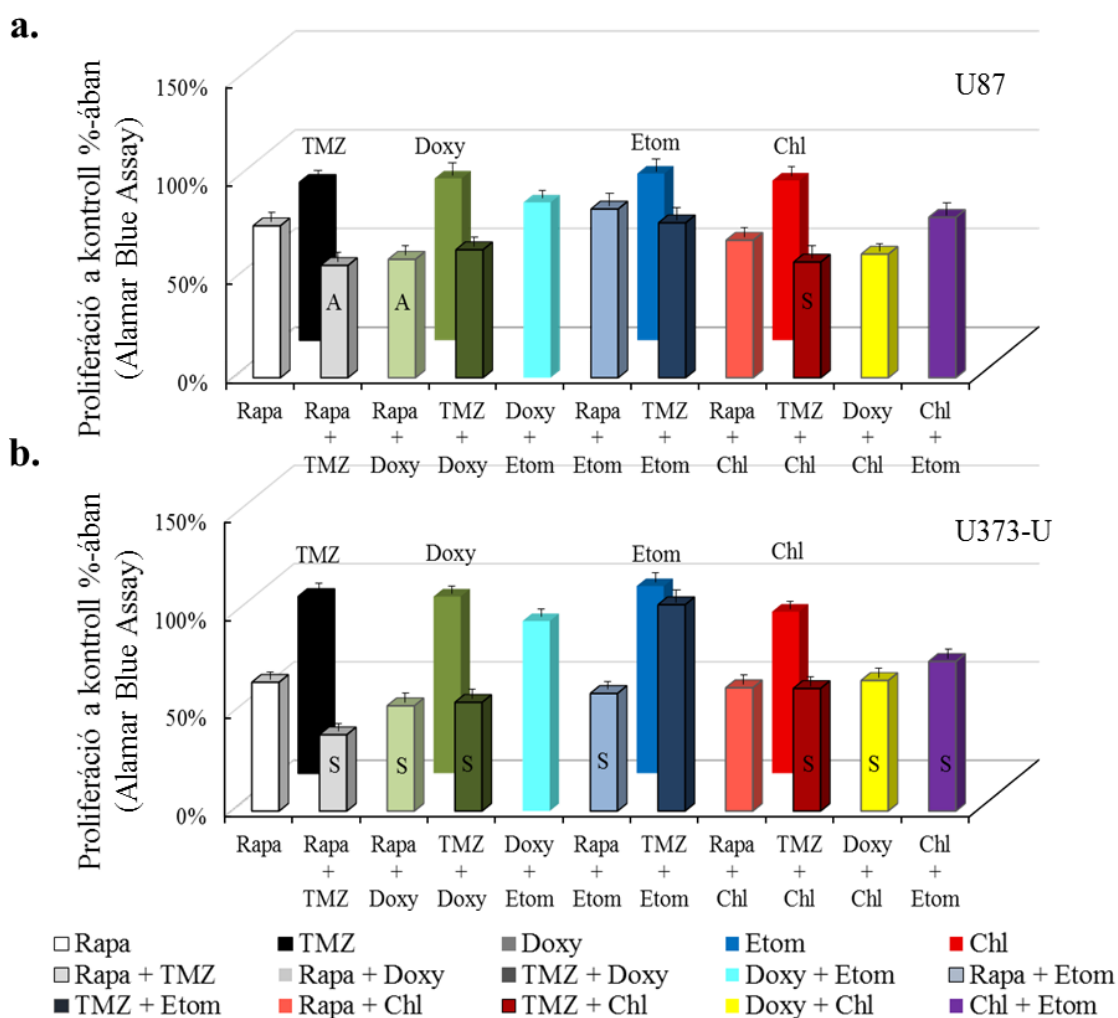
nélkül, p-(Ser)-Akt fehérje emelkedést; de Rictor fehérje lebomlására utaló jeleket; párhuzamosan lipid anyagcsereváltozásokat; GLS expresszió csökkenést, ill. mitokondriális COXIV expresszió csökkenést figyeltünk meg. Mindezek jelentősebb metabolikus zavarral és ennek jelentős proliferációt gátló hatásaival lehetnek összefüggésben.



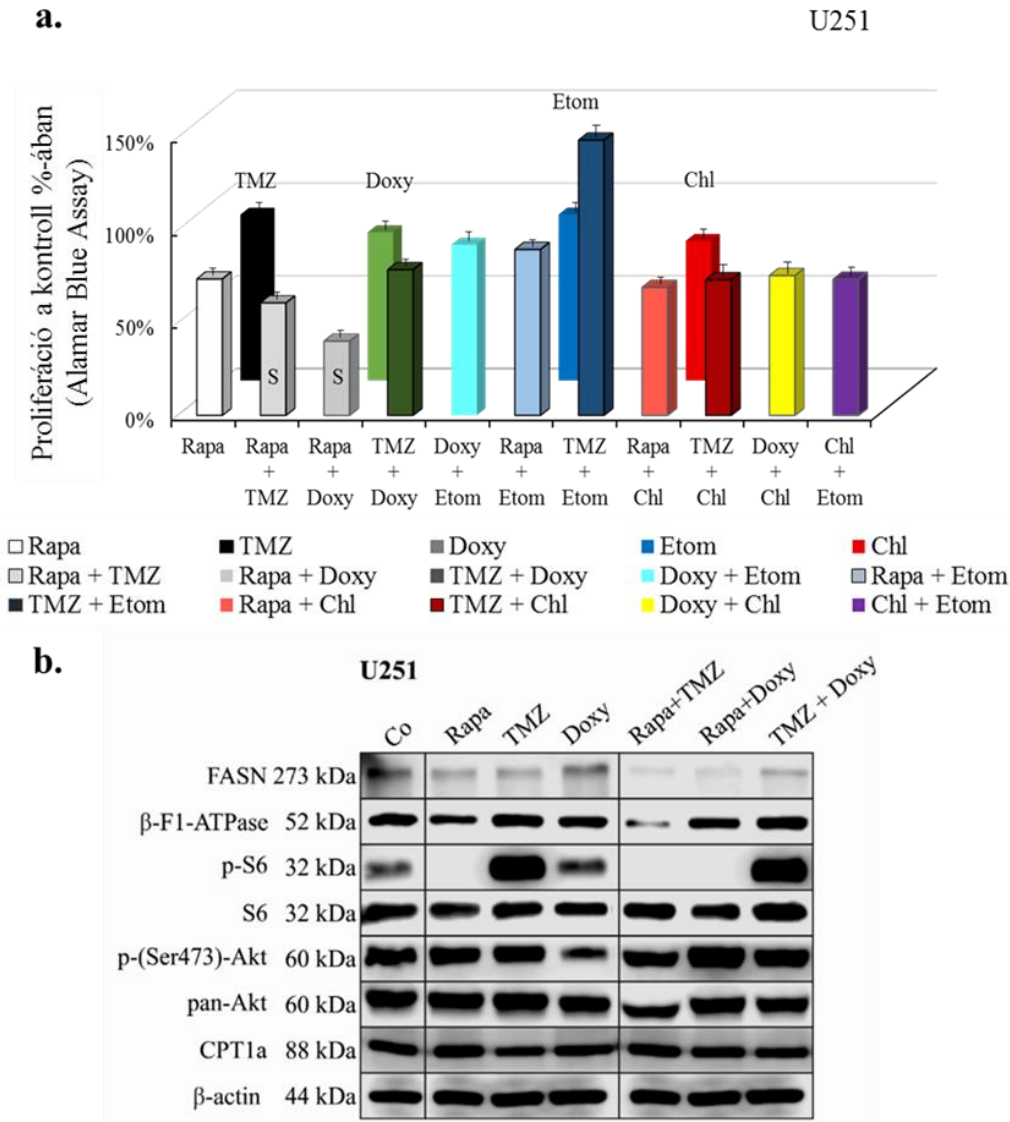
18. ábra. Rapa, TMZ és metabolikus inhibitor érzékenységek humán high grade glioma sejtvonalakban. A kemoterápiás és metabolikus kezelések (Rapa - rapamycin 50 ng/ml; TMZ - temozolomide 100 μ M; Doxy - doxycycline 10 μ M; Etom - etomoxir 50 μ M; Chl - chloroquine 50 μ M; BPTES-bisz-2- (5-fenil-acetoamid-1,3,4-tiadiazol-2-il) - etil-szulfid 10 μ M, 72 órás kezelés esetében) anti-proliferatív hatását Alamar Blue (AB) és SRB tesztekkel mutattuk ki U251, U87 és U373-U sejteken (a.). A szignifikáns ($p < 0,01$) változásokat *-al jelöltük. b. A metabolikus adaptáció mechanizmusára utaló fehérje expressziós változásokat is elemeztük Western blot, vagy WES Simple módszerrel az U373-U sejtvonalban.

4.1.4 Kombinációs kezelések hatása glioma sejtvonalakban

További kísérleteinkben a monoterápiában tesztelt metabolikus gátlószereket kombináltuk rapamycinnel, temozolomide-dal és egymással a három glioma sejtvonala 72 órás kezeléseiben (19-20. ábra). A korábban leghatásosabb chloroquine anti-proliferatív hatását egy további gátlószer hozzáadása vagy a temozolomide fokozta és a rapamycin többféle kombinációban is hatásosabbnak bizonyult, mint monoterápiában.



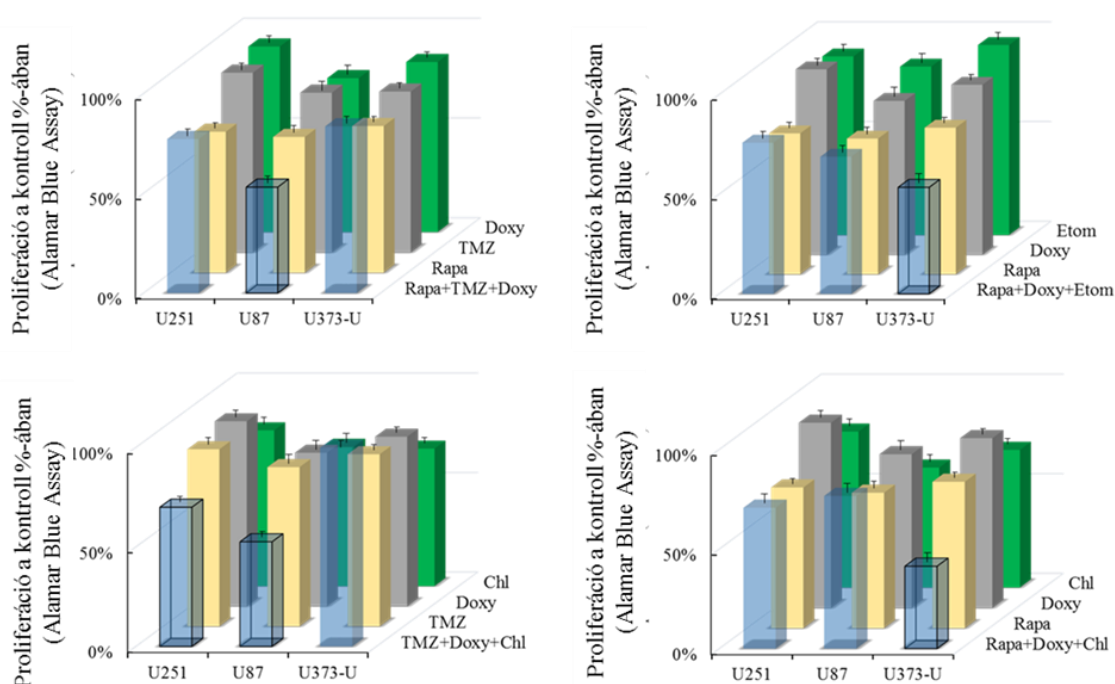
19. ábra. A rapamycin és temozolomide más anyagcsere gátlókkal kombinált *in vitro* proliferációs hatása U87 és U373 sejtvonalakban. Az Alamar Blue teszt eredményei 72 órás kombinált *in vitro* kezelés után U87 (a) és U373-U (b) glioma sejtekben (rapamicin - Rapa 50 ng/ml, temozolomide - TMZ 100 μ M, doxycycline –Doxy 10 μ M; etomoxir – Etom 50 μ M; chloroquine - Chl 50 μ M). A kombinációk additív (A) vagy szinergista (S) hatásait a CI számítás alapján jelöltük az adott kezelésekben.



20. ábra. A rapamycin és temozolomide más anyagcsere gátlókkal kombinált *in vitro* proliferációs hatása U251 sejtvonalban. a. Az Alamar Blue teszt eredményei 72 órás kombinált *in vitro* kezelés után glioma sejtekben (rapamycin - Rapa 50 ng/ml, temozolomide - TMZ 100 μ M, doxycycline –Doxy 10 μ M; etomoxir – Etom 50 μ M; chloroquine - Chl 50 μ M). A kombinációk additív (A) vagy szinergista (S) hatásait a CI számítás alapján jelöltük az adott kezelésekben. b. FASN, β -F1-ATPase, p-S6, p-(Ser473)-Akt and CPT1A fehérje expresszió változása a kezeletlen kontrollhoz képest mono- és kombinációs kezelések után U251 glioma sejtvonalban (50 ng/mL rapamycin + 100 μ M temozolomide—Rapa + TMZ; 50 ng/mL rapamycin + 10 μ M doxycycline—Rapa + Doxy; 100 μ M temozolomide + 10 μ M doxycycline—TMZ + Doxy (Western blot eredmények)—reprezentatív Western blot képek.

A rapamycin az etomoxir hatását fokozta az U251 és U373-U sejtekben és szenzitizálta mindhárom sejtvonalat a temozolomide-dal szemben. Két sejtvonalban szinergista (U251 és U373-U) és a harmadik esetében is legalább additív volt a rapamycin+temozolomide hatása. Előbbihez hasonlóan hatásos a doxycycline+rapamycin kombináció is. Vizsgálatainkat kiegészítettük az U251 sejtek esetében Rapa+TMZ, Rapa+Doxy és a TMZ+Doxy kombinációk egyes korábban is vizsgált fehérjék mennyiségét érintő hatásainak Western blot elemzésével (20. ábra). Fehérje szinten a zsírsav felépítésre utaló enzimek mennyisége csökkent, viszont párhuzamosan nem emelkedett a zsírsavoxidációval összefüggést mutató CPT1A szintje; mindez arra utalhat, hogy a sejt a zsírsavanyagcsere-változásokon keresztül nem tudott kompenzálni. A TMZ indukált mTORC1 aktivitás emelkedését – ami monoterápiában jellemezte a vizsgált TMZ rezisztens gliomákat – a rapamycin teljesen felfüggesztette, sőt az mTORC2 aktivitás – p(Ser)-Akt – emelkedés is elmaradt. Az OXPHOS aktivitáshoz szükséges β -F1-ATP-ase mennyiségét is jelentősen csökkentette az egyébként igen hatékony RAPA+TMZ kombináció, a terápia szempontból is érdekes TMZ rezisztencia áttörésében.

Ezt követően hármas kombinációs kezelések *in vitro* hatásait vizsgáltuk mindhárom sejtvonalban (21. ábra). A sejtek egyedi érzékenységét és a személyre szabott kezelések jelentőségét jól mutatták eredményeink. Az eltérő metabolikus alap jellegzetességekkel rendelkező sejtekben más-más hármas kombinációk bizonyultak a leghatékonyabbnak. A magasabb alap OXPHOS aktivitású és kevésbé Warburg fenotípusú U373-U sejtben a Rapa+Doxy+Etom, illetve a Rapa+Doxy+Chl volt rendkívül hatásos. Az inkább glikolitikus U87 sejtekben a TMZ+Doxy+Rapa, illetve a TMZ+Doxy+Chl. Míg a leginkább kiegyensúlyozott fenotípusú U251 sejtek esetében a hármas kombinációk nem voltak hatásosabbak a korábban hatékony Rapa+Doxy, illetve Rapa+TMZ kezeléseknél. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy kiismerve a daganatszövet metabolikus fenotípusát, heterogenitását egyes metabolikus gátlószerekkel fokozhatjuk a terápia hatékonyságát elzárva a tumorsejtek esetében a metabolikus alkalmazkodás útját.



21. ábra. Hármas gátlószer kombinációk proliferáció gátló hatásainak Alamar Blue teszt eredménye humán glioma sejtvonalakban. 72 órás hármas kombinációs kezelések *in vitro* hatásai. A monoterápiákhoz képest leghatékonyabb (szignifikánsan hatékonyabb $p < 0,05$) kombinációk hatásait keretes oszlopokkal jelöltük. Alkalmazott koncentrációk: rapamycin - Rapa 50 ng/ml, temozolomide - TMZ 100 μ M, doxycycline - Doxy 10 μ M; etomoxir - Etom 50 μ M; chloroquine - Chl 50 μ M, kombinációk: rapamycin+temozolomide+doxycycline - Rapa+TMZ+Doxy, rapamycin+doxycycline+chloroquine - Rapa+Doxy+Chl; rapamycin+doxycycline+etomoxir - Rapa+doxy+Etom ; temozolomide+doxycycline+chloroquine - TMZ+doxy+Chl).

4.2 Emlő daganatok vizsgálatának eredményei

4.2.1 mTOR és metabolikus gátlószer hatásainak összefüggése a fehérjeexpresszióval emlődaganat sejtvonalakban

In vitro kísérleteinkben 10 emlősejtvonal mTOR és metabolikus fehérje expresszió változását vizsgáltuk mTOR és más metabolikus gátlószerekkel végzett kezelés hatására (22-23. ábra).

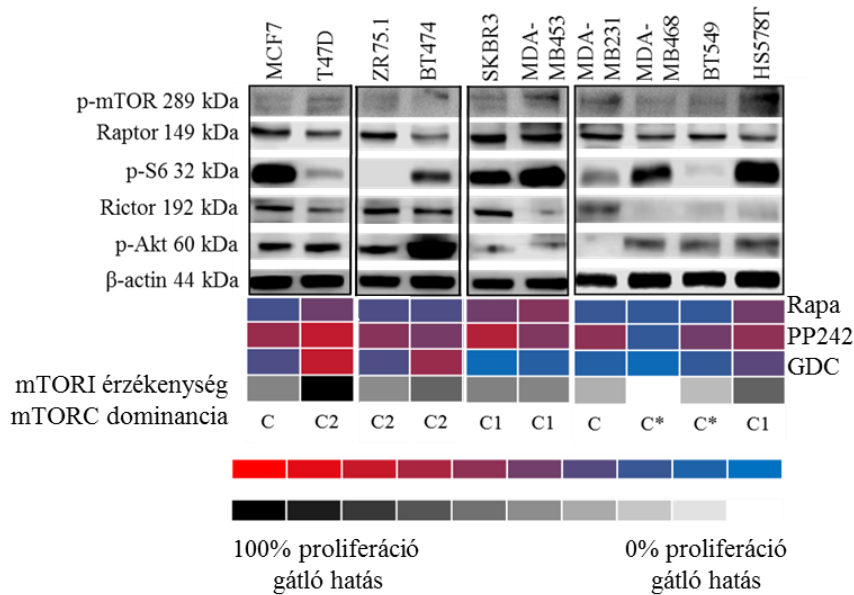
Az mTOR aktivitással összefüggő fehérjék mennyiségét és a gátlószer (rapamycin, PP242, GDC) hatását együtt értékeltük, majd ezek alapján 3 csoportba

osztottuk a sejtvonalakat: a. mTORC1 komplex és b. mTORC2 komplex aktivitású, illetve c. kiegyensúlyozott vagy gátlószer rezisztencia miatt el nem dönthető mTOR komplex aktivitású sejtvonalak (22. ábra). p-S6-nál alacsonyabb p-(Ser473)-Akt fehérje szint mellett, szignifikáns proliferációgátló rapamycin hatás és GDC (specifikus Akt-kináz gátló) rezisztencia (nem vagy alig volt proliferációgátló hatása) jellemezte az SKBR3, MDA-MB453 (HER2+) és a HS578T (TN) sejtvonalakat, így ezeket mTORC1 komplex aktivitású sejtvonalak közé soroltuk. Az mTORC2 komplex dominanciával rendelkező sejtvonalaknak tekintettük azokat, amelyekben a rapamycinnek nem vagy alig volt hatása, viszont GDC és/vagy PP242 (mTORC1/C2 komplex gátló) fokozott érzékenységet mutattak. Párhuzamosan pedig a p-(Ser473)-Akt fehérje mennyisége is szignifikánsan magasabb volt ezekben a sejtekben, mint a p-S6 mennyisége. Ez a T47D (LumA), ZR75.1 és BT474 (LumB) sejtvonalak esetében teljesült. A harmadik csoportba a rapamycin rezisztens sejtek közül azokat soroltuk, amelyekben a p-(Ser473)-Akt és p-S6 fehérjék aránya alapján ugyan RAPA érzékenységet vártunk volna, de sem a RAPA, sem a GDC esetében nem tapasztaltunk jelentős proliferációgátló hatást. Ezek a sejtek csak PP242 szenzitivitást (MCF-7, MDA-MB231, BT549) mutattak vagy egy sejt esetében még azt sem (az MDA-MB468 sejt teljesen rezisztens volt az mTOR útvonal gátlókkal szemben). Érdekes, hogy ebben a kevésbé mTOR gátló érzékeny csoportba tartozott a TN sejtvonalak többsége (MDA-MB231, MDA-MB468, BT549) mellett egy jó prognózisú LumA sejtvonal is (MCF-7). A leghatékonyabb proliferációgátló hatást a PP242, mTORC1 és C2 komplexet is gátló kezelések esetében tapasztaltunk, 72 óra kezelést követően a tíz sejtvonalból nyolc esetében ez a kezelés több mint 50%-kal csökkentette a proliferációt (22. ábra).

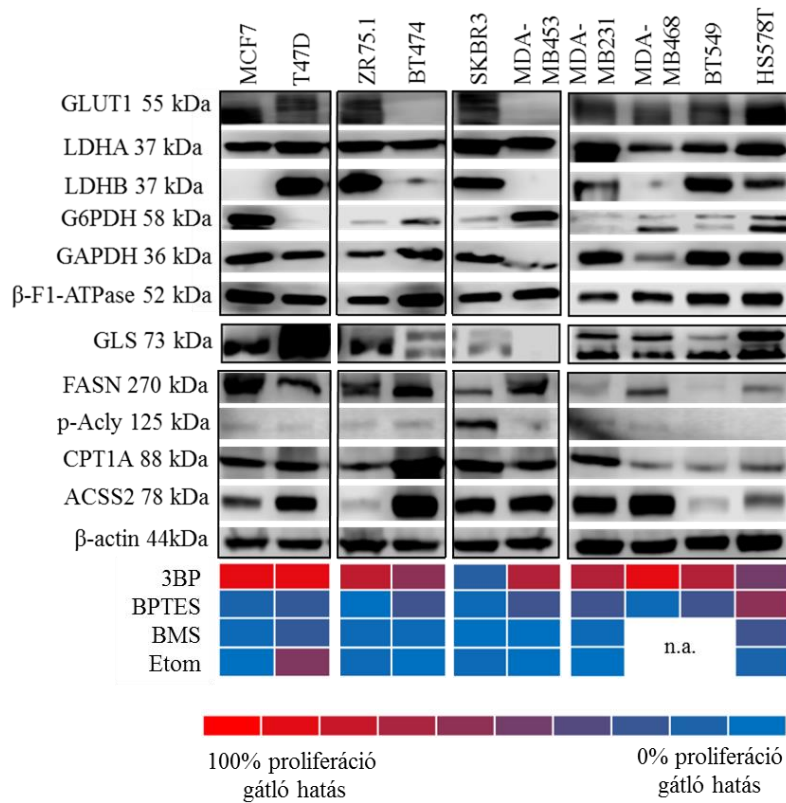
A metabolikus enzimek mennyisége és a gátlószer hatása között is megfigyeltünk összefüggéseket, azonban ezek alapján nem lehetett az mTOR aktivitáshoz hasonlóan különböző metabolikus fenotípusba besorolni a sejtvonalakat, mert a kép sokkal összetettebb volt. A gliomás vizsgálatainkhoz hasonlóan az intracelluláris metabolit-koncentráció viszonyok vizsgálatával is kiegészítettük ezeket az eredményeket.

Az összes sejtvonalban jellemzően magas LDHA fehérje mennyiséget mutattunk ki, míg a gliomákkal ellentétben az LDHB mennyisége mutatott jelentősebb különbségeket Western blot analízissel. A glikolitikus aktivitással összefüggő enzimek

megjelenése is csak kisebb expresszió különbségeket mutatva igazolta a sejtek glükózhasznosítását és a 3BP proliferáció gátló hatását *in vitro* környezetben. A tesztelt kezelések közül ez glikolízis gátló bizonyult a leghatásosabbnak a metabolikus gátlószerek között és az alacsonyabb GLUT1, illetve LDHA expresszió összefüggést mutatott a kisebb mértékű proliferáció gátlással a BT474 és HS578T sejtekben és a metabolikus gátlókkal szemben gyakorlatilag rezisztens SKBR3 sejtvonalban (23. ábra).



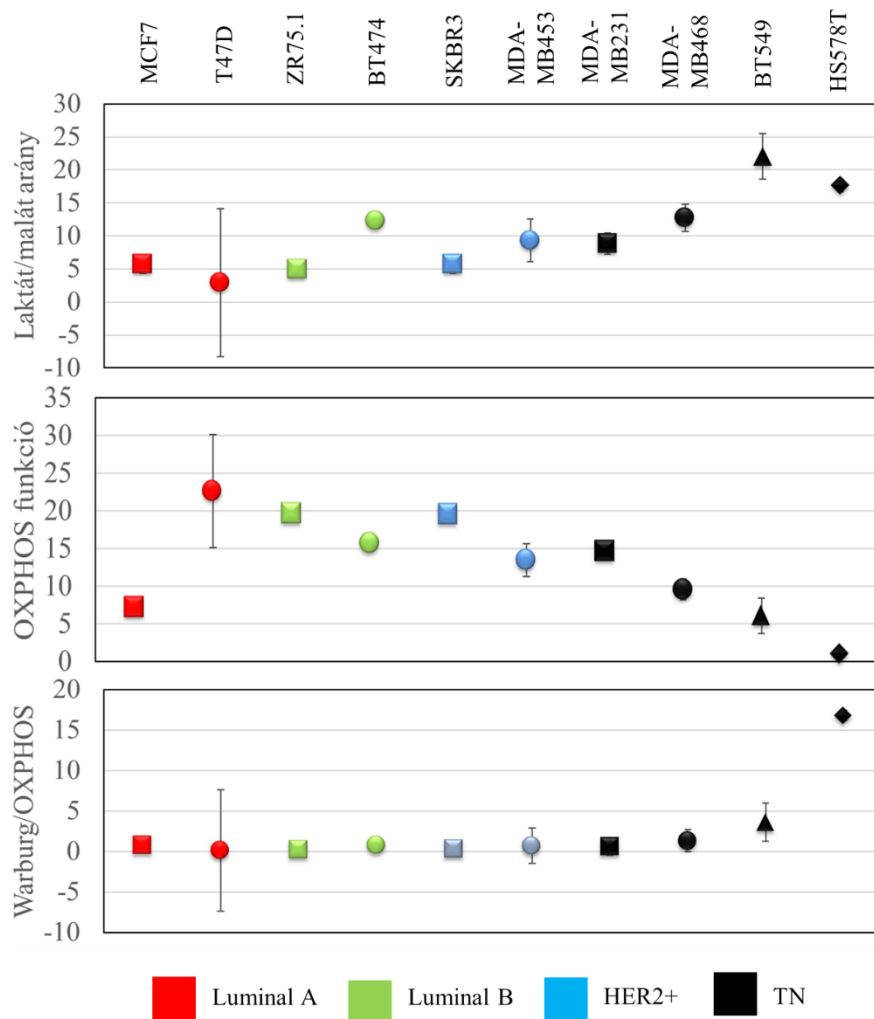
22. ábra. Szubtípus független mTORC1/C2 komplex aktivitás jellemző fehérje expresszió mintázatok humán emlődaganat sejtvonalakban. A reprezentatív Western blot-ok az mTOR-kináz hiperaktivitásával összefüggő fehérjék expresszióját mutatják a vizsgált sejtvonalak többségében. A balról jobbra a panelek a két-két LumA, LumB és HER2+ sejtvonalat majd a négy vizsgált TN sejtvonal látható. A 72 órás *in vitro* rapamycin érzékenységet (Rapa - 50 ng / ml), a C1 / C2 (PP242 - 1 μ M) és az Akt inhibitor (GDC - 1 μ M) kezeléseket színskálán tüntettük fel. A színskálán a gátló hatásokat, a színértékeket az Alamar Blue és az SRB tesztek eredményeinek átlaga alapján adtuk meg: kék/fehér (0%) - kezeletlen vagy teljesen rezisztens sejtek; piros/fekete (~ 90-100%) vagy gátolt proliferáció, nagyon érzékeny sejtek) Az mTOR út gátló érzékenységét úgy határoztuk meg, hogy három inhibitor skála összesített átlagát skáláztuk. Az mTOR komplexek jellemző aktivitását a fehérje expresszió és az inhibitor érzékenység együttes értékelése alapján is megadtuk (C1 - domináns mTORC1, C2 - domináns mTORC2, C - nincs komplex aktivitás dominancia, C* - mTOR inhibitor rezisztens fenotípus értékelést használtunk, amely meghatározások feltételeit az eredmények leírásánál definiáltuk).



23. ábra. Szubttípus független metabolikus fehérje expresszió különbségek humán emlődaganat sejtvonalakban. A felső Western blot panelen a glikolízissel, Warburg-effektushoz (GLUT1, G6PDH, GAPDH, LDHA, LDHB), glutaminolízishez (GLS) és lipid anyagcseréhez (FASN, p-Acly, CPT1A, ACSS2) kapcsolódó metabolikus enzimek expressziójának reprezentatív Western blot képét mutatjuk be. Az ábra alsó felén a 72 órás *in vitro* kezelések hatásait színskálán tüntettük fel. A színskálán a gátló hatásokat, a színértékeket az Alamar Blue és az SRB tesztek eredményeinek átlaga alapján adtuk meg: kék (0%) - kezeletlen vagy teljesen rezisztens sejtek; piros - (~ 90-100%) vagy gátolt proliferáció, nagyon érzékeny sejtek). Glikolízis gátlóként 3BP (3BP - 100 μ M), glutamináz inhibitoroként BPTES (10 μ M), lipid szintézis gátlóként BMS (10 μ M), lipid oxidáció gátlóként etomoxir (Etom 50 μ M) kezeléseket alkalmaztunk 72 órán keresztül *in vitro*.

A 10 sejtvonalból a három tripla negatív (MDA-MB468, BT549, HS578T) bizonyult a leginkább Warburg fenotípusúnak az intracelluláris laktát/malát arány alapján is. A glikolízis gátlóval szemben rezisztens SKBR3 sejtvonalban a magas laktát szint

mellett a metabolit-koncentrációk alapján számítható OXPHOS funkció is magas volt, ami magyarázhatja a sejtvonal gyors adaptációs képességét (24. ábra).



24. ábra. Metabolit arány különbségek a humán emlőtumor sejtvonalak között LC-MS metabolit koncentráció mérés alapján. A laktát/malát arány a sejtek Warburg fenotípusát jellemzi, az OXPHOS funkció jellemzésére (citrát / szukcinát) / (fumarát / malát) arányokat használtuk, Míg a két arány egymáshoz viszonyított jelentős eltolódását (Warburg/OXPHOS) a Warburg fenotípus javára két TN sejtvonalban figyeltük meg.

A glutaminolízis gátló BPTES a glikolízis és mTOR gátlókhoz képest kevésbé hatékonyan gátolta az emlőcarcinoma sejtek proliferációját (9 sejtvonalban csak 10-15%-os gátlás) *in vitro* (23. ábra). Szignifikáns gátlást csak a HS578T sejtvonal esetében figyeltünk meg, ebben a sejtvonalban azonban a GLS mindkét vizsgált izoformájának expressziója magasabb volt, mint a többi TN sejtben. A vizsgált lipidanyagcserét jellemző

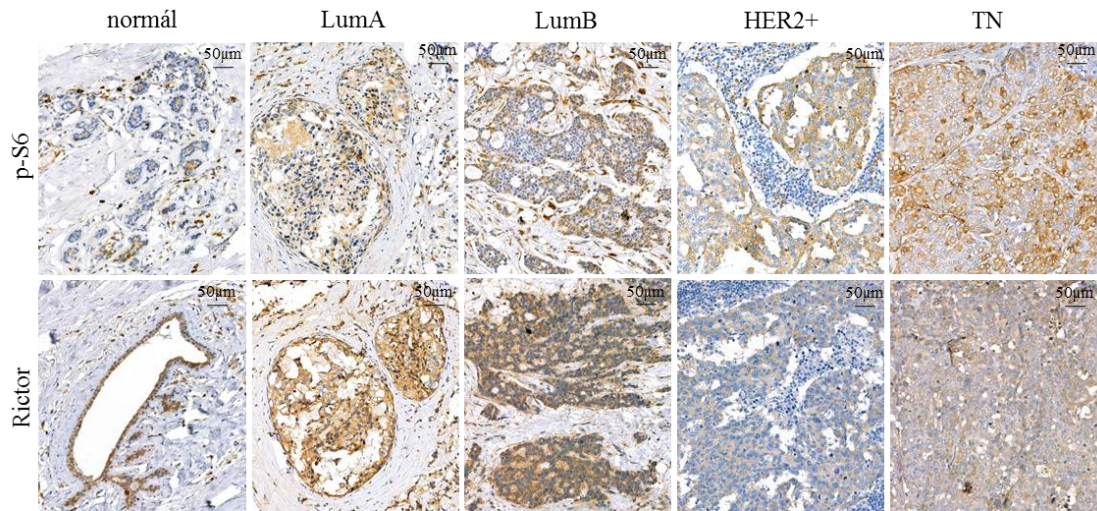
fehérjék közül a FASN inkább a nem-tripla negatív csoportokban volt magasabb, míg a CPT1A minden sejtvonalban kimutatható volt. A daganatsejt potenciális acetáthasznosításával összefüggő ACSS2 mennyisége mutatta a legnagyobb intertumorális különbségeket, de alapvetően valamennyi sejtvonaltípust jellemezte. A BMS (zsírsavfelépítés gátlószere) és a zsírsav oxidáció gátló (Etom) kevésbé bizonyult hatásos proliferációgátló szernek. Előbbi 20%-kal a T47D és HS578T sejtvonalakban, míg utóbbi 50%-kal a T47D-ben csökkentette a proliferációt.

Ezek alapján altípustól függetlenül nagyon különböző anyagcsere-útvonalakkal jellemezhetők az emlőcarcinoma sejtvonalak. Az emlődaganatok mTOR és metabolikus aktivitásának *in situ* szöveti jellemzésére, számos IHC marker tesztelése után az archivált szövetekben megbízhatóan működő p-S6, Rictor, LDHA, GLS, CPT1A, FASN fehérjék kimutatását végeztük el.

4.2.2 A kiválasztott mTOR és metabolikus fehérjék expressziójának *in situ* vizsgálata humán emlőcarcinomákban

Vizsgálatainkban közel 100 humán biopsziás mintában az mTORC1, illetve C2 komplex aktivitással összefüggő metabolikus fehérjék szöveti mennyiségét, eloszlását jellemeztük klinikopatológiai adatokkal összevetve.

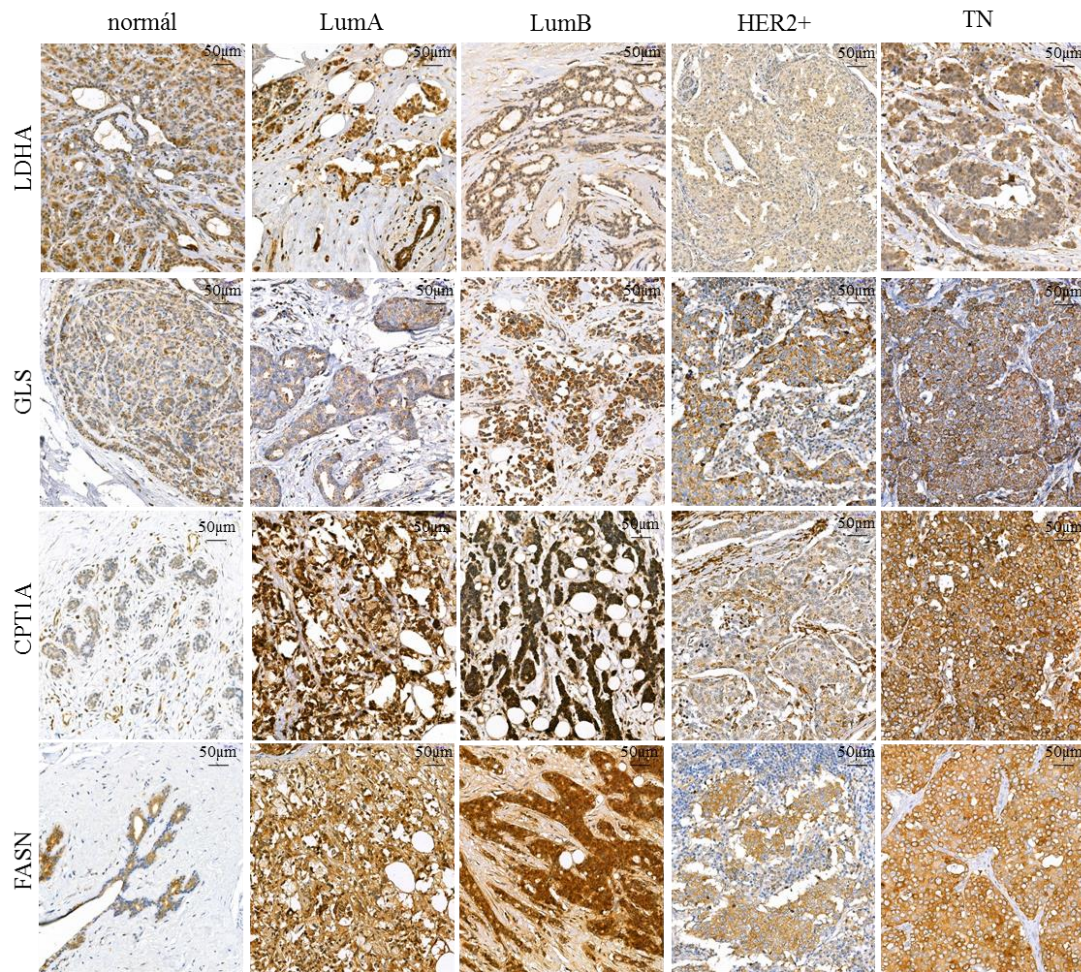
A munkacsoport korábbi IHC karakterizálási eredményeihez hasonlóan a p-S6 és Rictor festések jellegzetes citoplazmatikus jelleget mutattak, magi reakciókat azonban nem figyeltünk meg. A Rictor kifejeződés kisebb mértékű intratumorális különbségeket mutatott, amit csak néhány esetben figyeltünk meg. A normál szövetekhez, a normál duktális epitheliális sejtekhez hasonló, magas Rictor expresszió jellemezte a vizsgált daganatsejteket (medián H-score=180), bár egyedi esetekben a reakció gyengének bizonyult (<10%). Ezek az eredmények az mTORC2 komplex jelenlétére utalnak a normál duktális és az emlőtumorsejteken egyaránt. Az előbbivel ellentétben a normál szövetekhez képest az mTOR aktivitás, elsősorban mTORC1 aktivitás emelkedés jeleit, fokozott p-S6 expressziót mutattunk ki az emlődaganatos esetek többségében. A p-S6 reakció intra- és intertumorális expressziókülönbségeket is mutatott, ami leginkább csak ezt a fehérjét jellemezte a vizsgált hat célfehérje közül (25. ábra).



25. ábra. mTOR aktivitás jellemzéshez végzett p-S6 és Rictor IHC reakciók (DAB, barna) reprezentatív emlőcarcinoma metszeteken. A p-S6 jellegzetes citoplazmatikus festődése intra- és intertumorális festődési különbségei, ill. a Rictor a normál duktális sejtekhez hasonló magas expressziója jellemezte a daganatok többségét. Hematoxilin magfestés, azonos nagyítások (a képek job felső sarkában).

A további metabolikus fehérjék mind a FASN, mind a CPT1A a normál szövethez képest jelentős expresszió emelkedést mutatott a daganatsejtekben (medián H-score=210, illetve 240). A két fehérje funkció különbségei alapján fokozott lipidszintézis (magas FASN) mellett a sejtek a zsírsavak mitokondriumba szállításának inkább a blokkolását (a lipoxidációt nem serkentik) várnánk azonos tumorterületek tumorsejtjeiben. Ezt az inverz festődési mintázatot (adott terület magas FASN expressziója esetén alacsony CPT1A vagy ennek fordítottja) azonban az emlődaganatok intratumorális heterogenitásával összefüggésben nem figyeltük meg. Meglepő, de a FASN és CPT1A overexpresszió a szövetek azonos területein, gyakorlatilag azonos sejtekben volt jellemző az esetek közel 60%-ában (26. ábra).

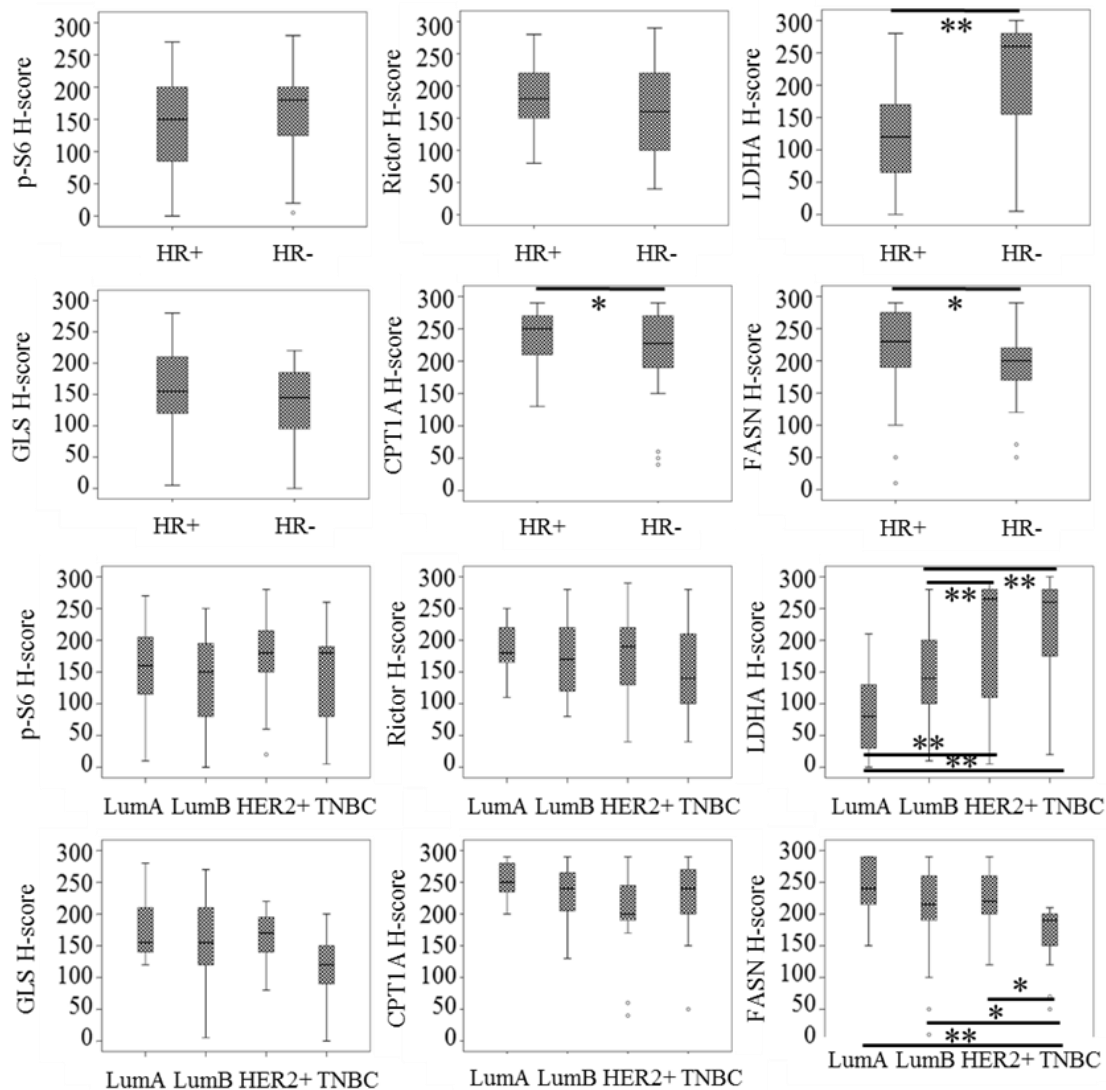
Előbbi lipidanyagcsere-változások mellett homogén citoplazmatikus LDHA és granuláris, mitokondriális GLS expresszió jellemezte a normál és a tumoros szöveteket is. Az egyes tumorok között ezekben jelentős különbségeket nem figyeltünk meg, bár egyes esetekben voltak eltérések (pl. Rictor).



26. ábra. Reprezentatív immunhisztokémiai reakciók a négy kiválasztott metabolikus aktivitást jellemző ellenanyaggal reprezentatív humán emlődaganat metszetekben. Anti-LDHA, anti-GLS, anti-FASN, anti-CPT1A, festéseket végeztünk. Szubsztrátként DAB (barna) kromogént, majd hematoxilin háttérfestést használtunk. A nagyítást feltüntettük.

Az immunreakciók intenzitás érték különbségeinek (átlag vagy medián H-score) összehasonlító vizsgálata érdekében minden szubtypusból azonos számú (közel 20 eset) esetből származó szövetet és csak invazív duktális carcinomákat vontunk be az elemzésbe, hogy a hisztológiai variációk ne zavarják meg az értékelésünket. A vizsgált személyek túlélési adatai reprezentálták a nemzetközi standard kezelések mellett várható eredményeket az elmúlt húsz évből választott, követett eseteinkben is. Az átlag H-score értékek alapján a HR-pozitív és -negatív esetekre a szubtypusoktól független a normál mirigyekéhez képest egyaránt emelkedett, közepes mértékű (p-S6 esetében a normál

szövetekhez képest emelkedett) mTOR aktivitás (p-S6 és Rictor) és GLS szint jellemző. A Warburg glikolízissel összefüggést mutató LDHA a HR-negatív, míg a lipidanyagcsere jellemzésben vizsgált CPT1A és FASN magasabb expresszió (H-score értékek) szignifikáns összefüggést mutattak a HR-positív státusszal. Igaz a CPT1A enzim magas expressziós szintje általánosan jellemezte az összes esetet, de összehasonlítva egymás között a szubtypusokat, igaz csak kis mértékben, de alacsonyabb CPT1A és FASN expressziós score volt jellemző a HER2+ és TN esetekben, mint a LumA és LumB csoportban (27. ábra).



27. ábra. mTOR és metabolikus enzimek expressziójának hormonreceptor és szubtypus szerinti összefüggései humán emlődaganatokban. Az átlag H-score értékeket és azok szórását ábrázoltuk. A szignifikanciát **p < 0,01, * p < 0,05 jelöléssel adtuk meg.

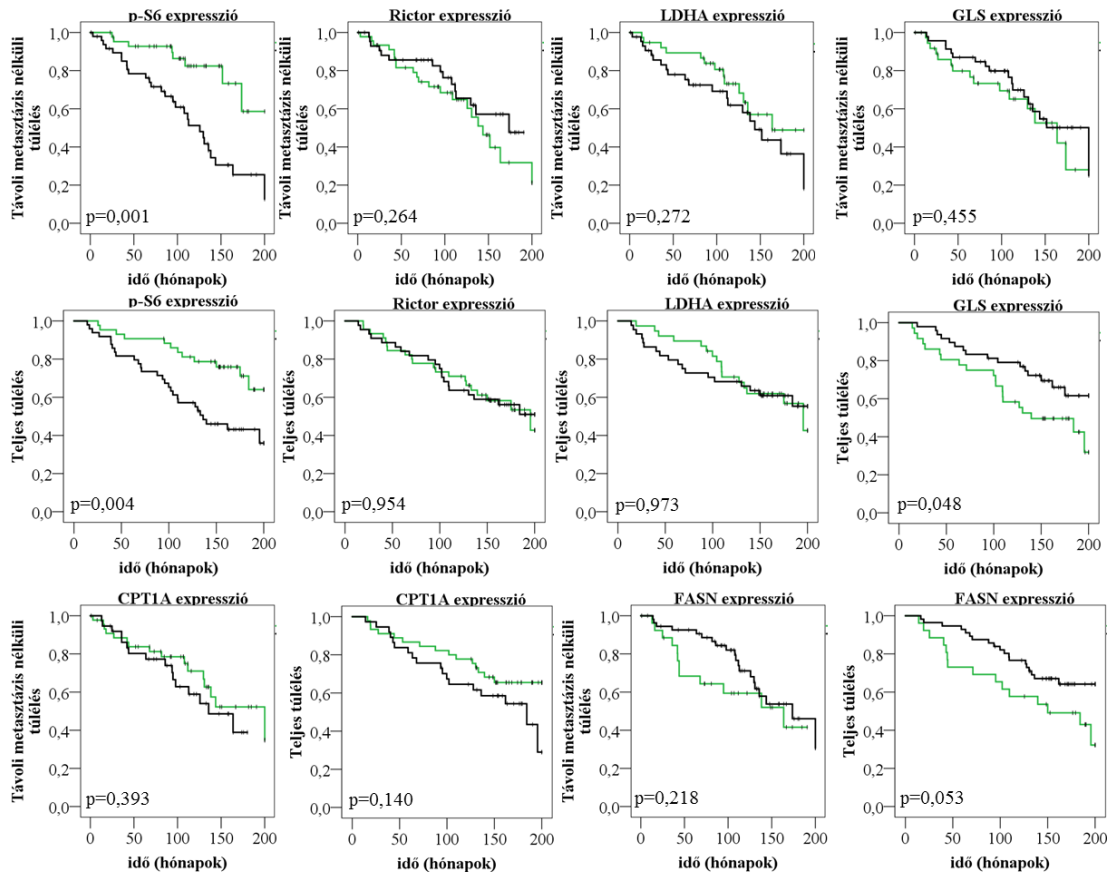
4.2.3 *In situ* mTOR és metabolikus fehérje expressziós különbségek prognosztikai jelentőségének vizsgálata

Az emlőcarcinoma szubtypusok metabolikus és mTOR aktivitás jellemzőinek vizsgálata mellett, az egyéni klinikai és túlélési adatok (távoli metasztázis mentes túlélés és teljes túlélés) és az IHC értékelésekben kapott adott fehérjék esetében meghatározott IHC H-score értékek összehasonlítását is el tudtuk végezni. Az adott festések esetében a betegeket alacsony és magas H-score értékű csoportokba osztottuk. A cut-off értéket a medián H-score érték alapján határoztuk meg. 150-es H-score cut-off értéket használtunk a p-S6, Rictor, LDHA és GLS esetében, mivel ezeknél az IHC értékeléseknél a medián H-score 150-200 között volt. A CPT1A és a FASN esetében a magasabb (>200) medián H-score alapján ezt 200-nál határoztuk meg. A magas p-S6 a távoli metasztázis kialakulásával és a betegek korával, az LDHA az altípusokkal, grádussal és a stádiummal mutatott szignifikáns összefüggést.

A magasabb p-S6 H-score szubtypustól függetlenül szignifikánsan összefüggött a távoli metasztázisok megjelenésével, a betegek életkorával és rövidebb metasztázis mentes, valamint rövidebb teljes túléléssel (3. táblázat, 27. ábra). A Rictor esetében nem találtunk összefüggést a túlélési adatokkal. Az LDHA alacsony illetve magas score összefüggött a szubtypussal, HR receptor státusszal (ahogy azt korábbi elemzésünk is mutatta), ezentúl szignifikáns összefüggést mutatott a grádussal és a stádiummal (3. táblázat) is. Bizonyos összefüggéseket a GLS expresszió és a hosszútávú teljes túlélés tekintetében is mutatott elemzésünk, meglepő, de a magasabb H-score értékek hosszabb túléléssel függtek össze szignifikánsan. Ennek hátterében állhat, hogy *in situ* a használt ellenanyag a két funkcióiban eltérő GLS izoforma elkülönítésére nem alkalmas. Nem szignifikáns, de tendenciában jelentős különbséget mutatott a CPT1A és FASN H-score értékek és túlélési adatok elemzése is. Ez mutatta a korábban leírt, várt inverz jelleget, miszerint magasabb CPT1A H-score a rosszabb, míg a magasabb FASN H-score a jobb prognózissal függött össze (28. ábra).

3. táblázat. Humán emlődaganatos minták mTOR és metabolikus immunreakcióinak klinikopatológiai adatokkal való összefüggései. *p<0,05 és **p<0,01.

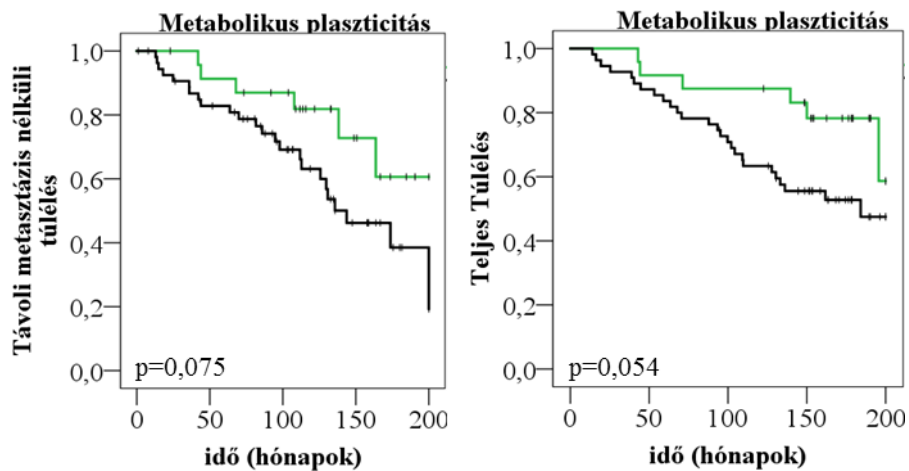
	p-S6 expresszió		Rictor expresszió		G1S expresszió		LDHA expresszió		CPT1A expresszió		FASN expresszió							
Eltekör (évek)	.alacsony"	.magas" p érték	.alacsony"	.magas" p érték	.alacsony"	.magas" p érték	.alacsony"	.magas" p érték	.alacsony"	.magas" p érték	.alacsony"	.magas" p érték						
≤55	25 (61)	16 (39)	17 (46)	20 (54)	19 (53)	17 (47)	20 (56)	16 (44)	18 (51)	17 (49)	11 (30)	26 (70)						
(n=41)																		
>55	18 (36)	32 (64)	27 (53)	24 (47)	17 (35)	31 (65)	18 (39)	28 (61)	27 (57)	20 (43)	15 (33)	30 (67)						
(n=54)																		
		0,021*			0,666		0,125		0,182		0,657		0,814					
Luminal A (n=16)	n=43	n=48	0,733	n=44	n=44	0,613	n=36	n=48	0,296	n=38	n=44	0,001**	n=45	n=37	0,454	n=26	n=36	0,208
Luminal B1 (n=19)	7 (47)	8 (53)		6 (40)	9 (60)		4 (29)	10 (71)		11 (79)	3 (21)		6 (40)	9 (60)		3 (20)	12 (80)	
Luminal B2 (n=22)	10 (56)	8 (44)		9 (47)	10 (53)		8 (42)	11 (58)		11 (69)	5 (31)		9 (50)	9 (50)		5 (31)	11 (69)	
HER2+ (n=19)	12 (55)	10 (45)		10 (56)	8 (44)		8 (42)	11 (58)		8 (47)	9 (53)		9 (53)	8 (47)		6 (30)	14 (70)	
TNBC (n=19)	7 (37)	12 (63)		7 (41)	10 (59)		5 (33)	10 (67)		5 (31)	11 (69)		11 (73)	4 (27)		3 (20)	12 (80)	
	7 (41)	10 (59)		12 (63)	7 (37)		11 (65)	6 (35)		3 (16)	16 (84)		10 (59)	7 (41)		9 (56)	7 (44)	
Grade	0,256		0,441		0,118		0,0002**		1,000		0,119							
1 (n=7)	3 (43)	4 (57)	4 (67)	2 (33)	1 (14)	6 (86)	6 (100)	0 (0)	3 (50)	3 (50)	0 (0)	6 (100)						
2 (n=38)	13 (37)	22 (63)	15 (43)	20 (57)	12 (36)	21 (64)	20 (61)	13 (39)	19 (56)	15 (44)	14 (41)	20 (59)						
3 (n=50)	27 (55)	22 (45)	25 (53)	22 (47)	23 (52)	21 (48)	12 (28)	31 (72)	23 (55)	19 (45)	12 (29)	30 (71)						
pT Stage	0,146		0,636		0,183		0,024*		0,625		0,154							
1 (n=44)	25 (58)	18 (42)	17 (43)	23 (57)	12 (32)	25 (68)	22 (58)	16 (42)	19 (53)	17 (47)	8 (21)	31 (79)						
2 (n=40)	15 (39)	23 (61)	21 (57)	16 (43)	18 (49)	19 (51)	13 (37)	22 (63)	20 (56)	16 (44)	14 (41)	20 (59)						
3 (n=5)	2 (50)	2 (50)	3 (60)	2 (40)	2 (40)	3 (60)	3 (75)	1 (25)	2 (40)	3 (60)	2 (40)	3 (60)						
4 (n=6)	1 (17)	5 (83)	3 (60)	2 (40)	4 (80)	1 (20)	0 (0)	5 (100)	4 (80)	1 (20)	2 (50)	2 (50)						
pN Stage	0,596		0,829		0,328		0,396		0,145		0,186							
x (n=1)	0 (0)	1 (100)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	1 (100)						
0 (n=42)	20 (50)	20 (50)	17 (45)	21 (55)	13 (36)	23 (64)	17 (45)	21 (55)	24 (67)	12 (33)	13 (34)	25 (66)						
1 (n=38)	16 (44)	20 (56)	20 (56)	16 (44)	15 (44)	19 (56)	17 (53)	15 (47)	16 (48)	17 (52)	8 (24)	26 (76)						
2 (n=12)	7 (58)	5 (42)	5 (45)	6 (55)	6 (55)	5 (45)	2 (22)	7 (78)	5 (50)	5 (50)	3 (43)	4 (57)						
3 (n=2)	0 (0)	2 (100)	1 (50)	1 (50)	2 (100)	0 (0)	1 (50)	1 (50)	0 (0)	2 (100)	2 (100)	0 (0)						
Metasztázis (n=38)	8 (23)	27 (77)	0,0003**	21 (58)	15 (42)	0,278	15 (45)	18 (55)	0,822	13 (39)	20 (61)	0,369	16 (50)	16 (50)	0,503	12 (38)	20 (62)	0,467



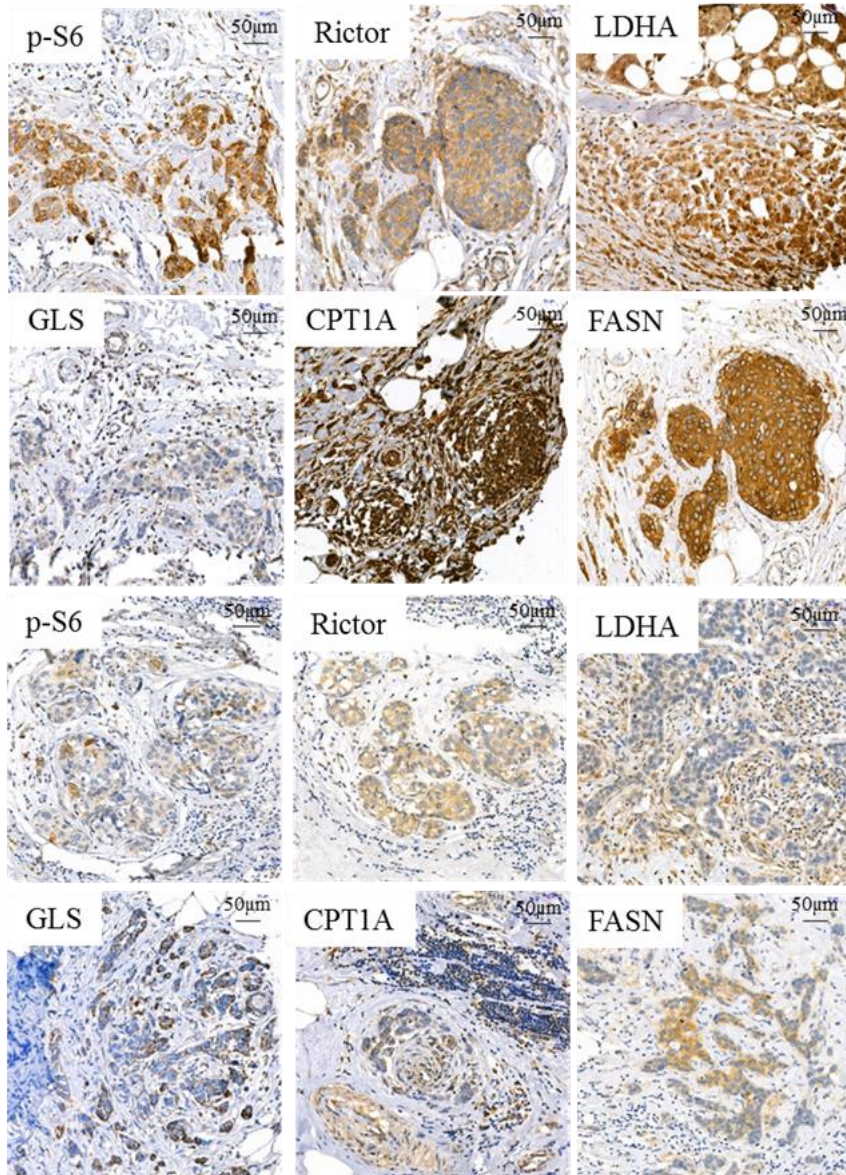
28. ábra. Kaplan-Meier analízis a magas és az alacsony H-score betegcsoportokban a távoli metasztázis nélküli (DMFS) és teljes túlélési (OS) adatok felhasználásával. 200 hónapos követés túlélési adatait vizsgáltuk. A medián H-score-ok figyelembevételével 150-es H-score cut-off érték mellett a p-S6, LDHA, GLS és Rictor, míg 200-as H-score cut off érték mellett a FASN és CPT1A in situ expresszió alapján alacsony (zöld) és magas (fekete) expressziójú csoportokat vizsgáltunk az analízisben.

A legérdekesebb túlélési összefüggéseket abban az elemzésben kaptuk, amelyben kombináltan értékeltük az mTOR aktivitást és a többi metabolikus útvonal markereket. Jó metabolikus alkalmazkodási képességűnek értékeltük (magas metabolikus plaszticitási érték) azokat az eseteket, amelyeknél a mTOR aktivitással összefüggő p-S6 festés H-score értéke mellett még legalább két másik metabolikus útvonal enzim H-score értéke magas volt. Ezek alapján nem szignifikánsan, de jelentős mértékben (trendszerűen) összefügg a jó metabolikus alkalmazkodási képessége a vizsgált daganatoknak a rossz prognózissal, a rövidebb távoli metasztázis mentes és teljes túléléssel (29. ábra).

Ez az expressziós mintázat, amelyben a vizsgált markerek közül a p-S6 magas H-score mellett legalább két további enzim magas H-score értékelést kapott, a négy másik vizsgált közül (LDHA, GLS, FASN vagy CPT1A), még jó prognózisú HR+ szubtypusok esetében is felhívhatja a figyelmet a várható rossz prognózisra, a szorosabb utánkövetésre (30. ábra). Illetve biztató kilátásokat jelenthet olyan TN emlőcarcinomás betegek esetében, ahol az előbbi vizsgált paraméterekkel meghatározott magas metabolikus alkalmazkodó képesség tumorsejtekben nem jelenik meg (30. ábra).



29. ábra. A magas metabolikus plaszticitás erős pozitív tendenciát mutatott az emlődaganatos betegek rosszabb túlélésével. Kaplan-Meier analízissel zöld szín az alacsony, míg fekete a magas metabolikus plaszticitást jelöli. A szignifikancia p értékét megadtuk.



30. ábra. Reprezentatív p-S6, Rictor, LDHA, GLS, CPT1A és FASN immunreakciók két emlőcarcinoma esetben. A felső 2 sorban egy magas metabolikus és mTOR aktivitású LumB típusú daganattal (a GLS kivételével) a beteg túlélése csak 38 hónap volt megfelelő kezelés mellett. Míg a másik, TN esetben (alsó 2 sorban) az alacsony H-score értékek hosszú 189 hónapos túléléssel (OS) társultak standard kezelés mellett. DAB-reakció (barna), hematoxin magfestés, azonos nagyítások (a képek job felső sarkában).

A KM-plotter adatbázis emlőcarcinomás betegek összegyűjtött mRNS expressziós, túlélési és egyéb klinikai adatait és ezek elemzésének lehetőségét felhasználva elvégeztük a vizsgált fehérjékhez kapcsolható gének mRNS expressziós adatainak prognosztikai szempontú analízisét is. Hasonló összefüggéseket találtunk LumA típusú emlőcarcinomás betegek adatainak elemzését követően: a magasabb S6, LDHA és CPT1A, illetve alacsonyabb FASN és GLS mRNS expresszió a rosszabb prognózisú betegek esetében volt jellemző (4. táblázat). Ez alátámasztja a saját *in situ* fehérje expressziós és mintázat értékelésünk alapján kapott eredményeket (4. táblázat). A Rictor és az mTOR mRNS-ek esetében eltéréseket mutatott a KM-plotter elemzésünk és a fehérje mintázatok IHC elemzése alapján kapott eredményünk. A Rictor és mTOR fehérjéknek a funkciói nemcsak mennyiségüktől, hanem egyrészt módosulásaitól (többféle foszoprotein - pl. mTOR foszforilációk aktivitásszabályozó hatásai), másrészt sejten belüli elhelyezkedésüktől vagy mTOR komplex partnereiktől is jelentősen függenek, ami magyarázatot adhat a különbségekre. Ezentúl az utóbbi két fehérje expressziós és aktivitás különbségeinek szerepe más tumorok esetében is inkább a magas mTOR aktivitás és az mTORC2 komplex (Rictor) jelenlétének rossz prognózisban játszott szerepére hívják fel a figyelmet.

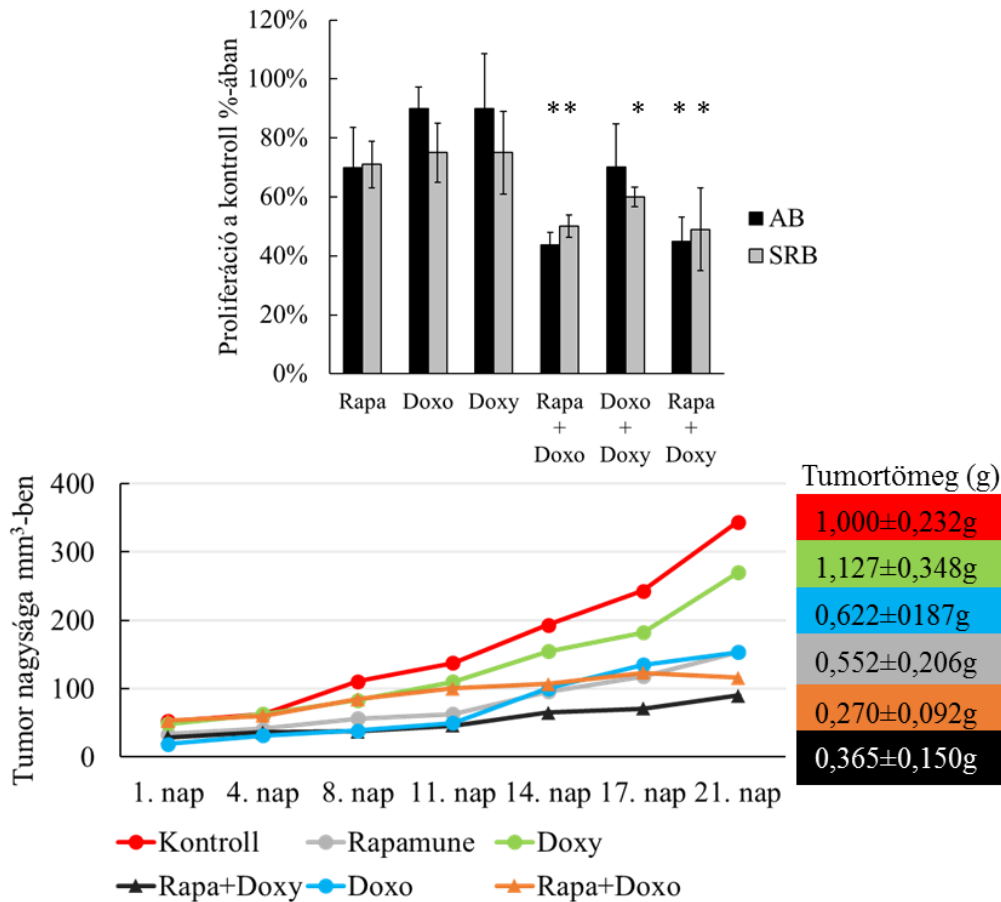
4. táblázat. KM-plotter metaanalízis eredménye mRNS expresszió és klinikai adatok összefüggésében különböző emlődaganat mintákban.

mRNS	Gén ID	KM-plotter Szimbólum	ER+PR+/- HER2-	ER+PR+/-HER2+/-	HR- HER2+	TNBC
			n=1933*	n=1149*	n=251*	n=255*
			*kivéve Rictor n=841 Hazard Ratio	*kivéve Rictor n=407 Hazard Ratio	*kivéve Rictor n=156 Hazard Ratio	*kivéve Rictor n=161 Hazard Ratio
mTOR	202288_at	MTOR	0,73	0,73	0,82	1,13
			0,0004**	0,0014**	0,31	0,5745
S6	201252_at	S6	1,41	1,39	1,24	0,77
			7,8*10-5**	0,0007**	0,2781	0,2283
Rictor	226312_at	Rictor	0,86	0,6	0,98	0,56
			0,2314	0,0011**	0,9457	0,0401**
LDHA	200650_s_at	LDHA	1,28	1,45	1,23	1,4
			0,004**	0,0001**	0,2857	0,1202
GLS	203159_at	GLS	0,68	0,74	0,87	1,11
			0,000014**	0,0017**	0,4729	0,633
FASN	212218_s_at	FASN	0,95	0,86	1,01	0,85
			0,5819	0,1107	0,9429	0,4485
CPT1A	203634_s_at	CPT1A	1,45	1,06	0,72	1,18
			1,9*10-5**	0,5398	0,0904	0,4363

További statisztikai elemzéseket végeztünk az adott vizsgált tényezők rizikó becslő értékének meghatározása érdekében. COX regresszió és multivariancia analízis (amelyben figyelembe vettük az életkort, szubtypust, HR státuszt, grade-et és stádiumot) szerint magas p-S6 H-score és az általunk meghatározni javasolt jó metabolikus alkalmazkodó képesség alkalmasak lehetnek rizikó meghatározásra (p-S6 – RR=2.528; 95% CI 1.278 to 5.00; p=0.008, metabolikus plaszticitás score – RR=2.48; 95% CI 1.021 to 6.021; p=0.045). Más általunk vizsgált IHC markerek ilyen szerepét a vizsgált betegszám mellett nem tudtuk igazolni. Ennek eldöntéséhez és a másik két faktor potenciális jelentőségének igazolásához nagyobb esetszámú, multiparametrikus vizsgálatokat igényelne.

4.2.4 Az mTOR gátló kezelések hatásának vizsgálata doxorubicinnel és doxycycline-nel kombinációban *in vitro* és *in vivo*

A gliomák esetében rendkívül hatásosnak talált rapamycin és doxycycline kezeléseket a ZR75.1 LumB humán emlőtumor sejtekkel *in vitro* és *in vivo* is tudtuk tanulmányozni. Nemcsak a RAPA és DOXY kezeléseket, hanem a doxorubicin (emlőcarcinomák esetében alkalmazható kemoterápia) kezeléseket és ezek kombinációit, hatásosságukat is vizsgáltuk. Eredményeink szerint a vizsgált három kombináció (Rapa+Doxy, Rapa+Doxo, Doxo+Doxy) szignifikánsan jobban csökkentette a sejtek proliferációját *in vitro*, mint a monoterápiák. *In vivo* hasonló eredményességet tapasztaltunk, a tumorok méretét és végleges tömegét is szignifikánsan csökkentették a kombinációs kezeléseket (31. ábra). *In vivo* leghatásosabbnak a Rapa+Doxy kezelés bizonyult, ami tudomásunk szerint az első *in vivo* eredmény a rapamycin és a doxycycline *in vivo* tumornövekedés gátló hatásával kapcsolatban.



31. ábra. Rapamycin, Doxycycline, Doxorubicin és ezek kombinációinak *in vitro* és *in vivo* hatása humán emlődaganat modellben. a. ZR75.1 sejtek végzett rapamycin (Rapa 50 ng/ml), doxorubicin (doxo 50 ng/ml), doxycycline (Doxy 10 μ M) hatásainak proliferáció gátló hatása (72h) Alamar Blue és SRB tesztek eredményei alapján. **b.** ZR75.1 xenograft tumorok tumornövekedésének változása 3 hetes rapamune- (1 mg/mL, per os 3 mg/kg testtömeg), doxorubicin- (2mg/mL, i.p. 2mg/kg testtömeg) és doxycycline-monoterápiás (200mg/kg testtömeg), valamint rapamune+doxorubicin és rapamune+doxycycline kombinációs kezelés mellett (heti háromszor). A tumortérfogatot az alábbiak szerint számoltuk: $\pi/6 \times (2 \times \text{kisebb (tumorátmérő} + \text{nagyobb átmérő})/3)^3$, a grafikon mellett a kezelés végén mért tumortömegeket is megadtuk. A szignifikans ($p < 0,05$) különbségeket jelöltük.

5 Megbeszélés

Napjaink tumorbiológiai és klinikai vizsgálatai egyre növekvő érdeklődést mutatnak a tumorsejtek metabolikus tulajdonságai – ezenbelül az *in vivo* szöveti heterogenitás és az metabolikus plaszticitás (sejtek metabolikus adaptációs képessége) jellemzése iránt (266). A közelmúltban megjelent transzkriptomikai és metabolomikai elemzések eredményei arra utalnak, hogy egy igen összetett metabolikus változás is felmerül a tumorokban. A jól ismert glikolitikus és OXPHOS fenotípusok mellett további ún. hibrid (Warburg+OXPHOS; W/O) és metabolikusan inaktív állapotok is kialakulhatnak az egyes sejtekben vagy adott tumorokban. Az eddigi eredmények azonban elsősorban szöveti homogenizátumokból (adatbázis eredmények) és/vagy sejtes kísérletekből származnak, a patomorfológiai IHC-vizsgálatokat ritkán végezzék el (57, 267).

Az anyagcsere-jellemzés fontosságát mutatják a bemutatott *in situ* szöveti szintű vizsgálataink és a kapcsolódó sejtvonali kísérleteink eredményei is. Munkánk során megvizsgáltuk a két tumor típust, a gliomákat és emlődaganatokat reprezentáló sejtvonalak metabolikus adaptációval kapcsolatos mTOR aktivitás és enzim expressziós profilját - mint modellrendszereket –, és többféle gátlószer hatásait (mTOR, glikolízis, glutaminolízis és lipid-metabolizmus - lipid-oxidáció és szintézis gátlók) is. Párhuzamosan a jellegzetes érzékenységi különbségek és a jelenlegi terápiás eredmények háttérében az előbbi folyamatokat betegek szövetmintáin végzett *in situ* vizsgálataink eredményeivel is összevetettük, hogy alátámasszuk a metabolikus heterogenitás jelentőségét és bemutassuk a metabolikus gátló kombinációs kezeléseknek potenciális onkoterápiás felhasználását.

5.1 Humán glioma szövetek és sejtvonalak mTOR aktivitása és metabolikus jellegzetességei, mint lehetséges terápiás célpontok

A jelenlegi standard kezelések (műtét, radio- és sugárterápia) eredményeit és az új terápiák bevezetésének sikerét számos tényező befolyásolhatja glioblastómás betegek esetében. Ilyenek, a tumor speciális lokalizációja (vér-agy gát megakadályozza egyes gátlószer eljutását a tumor környezetébe; műtéti kockázatok és a sugárterápia életminőséget jelentősen korlátozó roncsoló hatásai), a daganatok genetikai és szöveti heterogenitása, rezisztencia kialakulása, vagy egyéb toxikus mellékhatások (268, 269).

Előbbiek korlátozó hatásai hozzájárulhatnak az agydaganatok kiújulásához és a jól ismert kedvezőtlen terápiás eredményekhez. A műtéti beavatkozás és terápiás kezelés mellett újra megjelenő daganatokért gyakran a dormant-, vagy daganat őssejteket teszik felelőssé. A legújabb ismereteink alapján ezeknek a sejteknek a proliferáló daganatsejtektől eltérő metabolikus aktivitásuk lehet és ez is hozzájárulhat a terápiás kezelések vagy akár a célzott kezelések hatásától független túlélésükhöz, terápia rezisztenciájukhoz (270). Napjainkban a gliomák kezelésének fejlesztésében egyrészt a kezelőszerek célbajuttatásának javítása, másrészt az angiogenezis gátlók, vagy az EGFR mellett a PI3K/Akt/mTOR jelátviteli útvonal gátlók alkalmazása, illetve számos alternatív terápiás lehetőség (fotodinamikus, hipertermiás kezelés és immunterápiás kezelések) szerepel (268, 271). Minden eddigi próbálkozás azonban gyakorlatilag sikertelen és nem javította lényegesen sem a túlélését sem az életminőségét a betegeknek. A tumorsejtek alkalmazkodásának egyik, még kevésbé feltárt és a gliomák esetében is kevésbé jellemzett eleme a tumor növekedése és a kezelések mellett a daganatsejtek, így a glioma sejtek anyagcsere változásainak megismerése. A tumorsejtek metabolikus plaszticitásának, a mikro környezeti kapcsolatainak, illetve ezek terápia közben bekövetkező változásainak megismerése, és ennek az alkalmazkodásnak a gátlása még egy eddig nem kihasznált eszköz lehet a jövőben (272). Az új fejlesztésekhez azonban pontosabb ismeretekre, a tumorok *in situ* vizsgálatára, metabolikus jellemzésére, még több molekuláris adatra lenne szükség. A jelenlegi gátlószerekkel szembeni rezisztencia kialakulásának mechanizmusáról és az ennek a háttérében álló metabolikus tulajdonságokról, anyagcsere útvonalak átrendeződéséről, ezek szerepéről a tumor evolúciójában pedig még nincs sok adatunk. A daganatbiológiai kutatások fontos új területe a metabolikus átprogramozás - redox homeosztázis fenntartása, energia és építőelemek biztosítása a proliferációhoz, vagy nyugvó állapot bioenergetikai háttérének biztosítása - és a rezisztencia mechanizmusok kapcsolatának megismerése (3).

In situ vizsgálatainkban különböző mTOR és metabolikus fehérjék expresszióját jellemeztük. Mi is megfigyeltük a glioma szövetek intra- és intertumoralis heterogenitását, a normál szövethez képest magasabb mTOR aktivitását és ezzel párhuzamosan bizonyos metabolikus enzimek mennyiségének változásait gliomákban, ami nagyfokú metabolikus plaszticitást jelenthet a műtétilag el nem távolított tumorsejteknek.

Az IDH mutáns esetekben általunk is kimutatott glutamináz expresszió fokozódása nem ismeretlen, ez a glutamin hasznosítására és ennek IDH mutáns gliomákban kitüntetett szerepére utal. Korábbi vizsgálatainkban mi is igazoltuk, hogy az IDH mutáns gliomák mTOR aktivitásfüggő 2-HG onkometabolit termelésének forrása a glutamin és ennek gátlása kiemelt jelentőségű is lehet ezekben az esetekben (273).

A CPT1A expressziójának fokozódását és potenciális jelentőségét már mások is megerősítették (274). Több esetben vizsgálták a lipid anyagcsere mellett a glutaminolízist és glikolízist (275), illetve ezek mértékének mTOR aktivitástól való függését, amit munkacsoportunk is vizsgált glioma sejtvonalakban (276). Saját *in vitro* vizsgálataink is megerősítették, hogy akár egyszerre több metabolikus adaptációs útvonal magas aktivitását jellemző fehérje expressziós mintázat egy sejtvonalban összefügghet a temozolomide rezisztenciával vagy csökkent rapamycin érzékenységgel. Temozolomide és rapamycin monoterápiás kezeléseket követően a sejtek metabolikus alkalmazkodásának jeleként a glikolitikus, OXPHOS és lipid anyagcsere enzimek expressziója egyaránt megváltozhat. Hasonló, jellegzetes OXPHOS eltolódásról számoltak be temozolomide és radioterápiás rezisztencia vizsgálatok közben más munkacsoportok is gliomákban (277-279).

Munkánkban CPT1A, ACSS2 mennyiségi növekedését és a FASN csökkenését figyeltük meg sejtvonal függően, ami az adott sejtek alkalmazkodásában a lipid anyagcsere változására és acetát források intracranialis hasznosítására hívják fel a figyelmet. Ezek az eredményeink alátámasztják mások megfigyeléseit, amelyek rámutatnak az acetát és lipidek hasznosításának potenciális szerepére a glioma sejtek túlélésében, terápia rezisztenciájában (280). Ez összefügghet azzal az irodalmi adattal is, ami glükóz megvonás esetén AMPK aktivációt és az autofágia aktiválása mellett fokozott acetát hasznosítást írt le glioma sejtekben (281). Az általunk szöveti szinten megfigyelt CPT1A, FASN és ACSS2 expresszió különbségek előbbiekkal összefüggésben arra utalnak, hogy az acetát és lipid anyagcsere szerepet játszik a terápia rezisztencia kialakulásában ebben a daganattípusban. A CPT1A fehérje fontos egyik sebességmeghatározó enzime a zsírsav oxidációnak is, gátlása etomoxirral lelassította a glioma tumornövekedését xenograft modellben (272, 282).

In vitro proliferációs vizsgálatainkban metabolikus gátlószereket használtunk, amelyek önmagukban kevésbé voltak hatásosak. Gyakran figyeltük meg, hogy a

párhuzamosan ezekben az esetekben a Rictor expresszió emelkedett a különféle kezelések után (TMZ, Doxy, Etom, BPTES), aminek szerepe lehet az anyagcsere-változások irányításában és a terápia rezisztencia kialakulásában. Ezek alapján az mTORC2-nek fontos szerepét erősíthetjük meg a metabolikus eltolódásban. Pl. kimutatott fokozott AMPK expresszió és az autofágia aktiváció a rezisztencia mechanizmusokban arra utalhat, hogy a metabolikus gátlókat érdemes lenne dual-mTOR inhibitorokkal kombinálni. Az mTORC1 és C2 komplex-ek esetében egyre több adat támasztja alá, hogy szerepük lehet a fenti metabolikus folyamatok szabályozásában (283, 284).

Számos tanulmányban sugallják, hogy a tumorok bioenergetikai változásai a sejten belül további dinamikus változásokat okoznak (285), így adott folyamatok kombinált gátlása áttörheti a rezisztencia mechanizmusokat. Ezek és más, különböző támadáspontú metabolikus gátlószerek akár metabolikus katasztrófát is előidézhetnek a high grade glioma sejtekben. A temozolomide kezelés pl. autofágia inhibitorral kombinációban mutatott jelentős *in vitro* glioma növekedés gátló hatásokat (286, 287). Több tanulmány van az autofágia gátlók kombinált alkalmazásának eredményeiről, pl. célzott kináz inhibitorokkal is gliomákkal kapcsolatban (288). Ezekkel az eredményekkel összefüggésben leírták, hogy high grade gliomák magas LC3 expresszióval rendelkeznek, ami támogatja a túlélésüket (289), ez megerősíti az *in vitro* eredmények *in vivo* jelentőségét. Fontos azonban a daganatok kialakulásában és progressziójában az autofágia vitatott szerepére is felhívni a figyelmet, ami még összetettebb lehet *in vivo* vizsgálatok esetében (290). Kísérleteinkben kimutattuk az autofágiát gátló chloroquine érzékenységet a vizsgált sejtekben, és ennek sejtvonal függő szinergista hatásait is megfigyeltük egyes kombinációkban más gátlószerekkel (Rapa+Chl és Chl+Etom). Az etomoxir kombinációs hatásai azonban csak egy sejtvonalban voltak jelentősebbek.

További érdekes megfigyelésünk a mitokondriális OXPHOS eltolódás több mono- vagy kombinált kezelést követően (pl. Rapa és Chl, vagy Rapa+Chl), amelyekre az Alamar Blue és SRB tesztek eredmény különbségei is felhívták a figyelmet. Ezt az OXPHOS-ra való metabolikus váltást többféle kezeléssel lehet gátolni, pl. Gboxin-nal, vagy más mitokondriális funkciókat gátló kezelésekkel, akár bizonyos antibiotikumokkal is (tigecycline, doxycycline). Utóbbi antibiotikumok felhasználási lehetőségeit már szintén tesztelik (100, 109). A doxycycline kezelés hatásait még 2007-ben Wang-Gillam és munkatársai írták le glioma sejtekben, vizsgálataikban a nagy dózisu doxycycline (10

µg/ml) ugyan csak alacsony proliferáció gátló hatást mutatott, de MMP2 expresszió gátló hatást is megfigyeltek (291). Ez vizsgálataik szerint potenciális migráció gátló lehetőség és ezt a hatást a doxycycline esetében egy másik munkacsoport is valószínűsítette TSC2 mutáns sejtekben (292). A doxycycline és más antibiotikumok tumorelles hatását több csoport is intenzíven vizsgálja, sőt tumor össejtekre gyakorolt hatását is kimutatták már (293). Egy munkacsoport a doxycycline-t *in vitro* és *in vivo* is tesztelte glioma modellekben, ahol A172 astrocytoma sejtekben nagyon hatékony tumornövekedés gátlónak bizonyult (294). Munkámban alkalmazva önmagában doxycycline-t, a BPTES-hez (glutaminolízis gátló) hasonlóan nem tapasztaltunk jelentős poliferáció gátló hatást. Ennek háttérében a mitokondirális folyamatok gátlásakor megjelenő glikolitikus kompenzáció lehet, amire a sejtek LDHA expressziója és a tápfolyadékban korlátlanul elérhető glükóz lehetőséget teremt (295). Jelentősége van azonban ezeknek a kezeléseknél, mert a doxycycline a rapamycinhez hasonlóan temozolomide-ra szenzitivizálta a glioma sejteket.

Legérdekesebb eredményünk, hogy a doxycycline fokozta a rapamycin anti-proliferációs hatását az összes vizsgált glioma sejtvonalon. Összességében ez a kombináció a különböző kombinációs kezeléseknél várható mellékhatás profilja alapján is jól tolerálható lehet, így hasonló hatékonyság mellett óriási lehet a rapamycin+doxycycline kombináció jelentősége. A vizsgált hármas kombinációs kezeléseknél sejtvonalon függően egy-egy sejtvonalon esetében kaptunk csak jelentősebb hatásfokozódást. Így figyelembevéve a mellékhatások fokozódását is a legjobb kombinációknál a különböző rapamycin kombinációknál (TMZ/Doxy/Etom/Chl) tűnnek, kivéve a Rapa+BPTES-t. Mindezek alapján a rapamycin jól ismert metabolikus gátló hatásai (gátolhatja a glikolízist, glutaminolízist és számos kináz aktivitást, ami egyéb sejt-folyamatokhoz kapcsolódik) miatt ideális bázisa lehet egy jövőbeni metabolikus gátló kezelésnek más gátlókkal kiegészítve, amennyiben a mellékhatásokat a betegek tolerálni, a klinikusok menedzselni képesek.

Eredményeink arra utalnak, hogy érdemes megfontolni metabolikus gátlószerek alkalmazását a gliomás betegek terápiájában. Önmagukban a hagyományos kemoterápiás szerek és az mTOR gátlók nem hozták meg a várt eredményeket, ezek oka lehet a szövetek heterogenitása, a metabolikus plaszticitás és a terápia közben a celluláris metabolikus átrendeződések megjelenése. A rezisztencia kialakulása, illetve a dormant

sejtek állapota összefügghet a Warburg/OXPHOS fenotípusos eltolódással, a mitokondriális folyamatok felerősödésével, amit glioma sejtekben eredményeink is alátámasztanak.

A megváltozott mitokondriális funkciók gátlását, a kemoterápiára való érzékenység növelését gliomák esetében korábban az ETC komplex I-et is gátló metformin, illetve phenformin adásával sikerült elérni (296). Ezek a nem daganatellenes gyógyszerek több daganat típusban is ígéretesnek bizonyultak, illetve gliomákban *in vitro* és *in vivo* modellekben is tesztelték sikeresen (297). Eredményeink alapján azonban nem csak ezeknek a nem daganatellenes készítményeknek kell további figyelmet szentelni. A doxycycline felhasználásának története a fertőzésekben hosszú és biztonságos, bizonyítottan áthatol a vér-agy gáton is (298), eredményeink szerint pedig potenciálisan hatékony a glioblasztóma kezelési kombinációkban, ahol a jelenlegi terápiában csak kevés szer elérhető.

A vizsgált glioma sejtvonalakban az eredeti metabolikus fenotípus és a kezelésekre bekövetkezett metabolikus változások nem mutattak egyértelmű összefüggést a metabolikus változásokban. A fenotípusos változásokhoz kapcsolódó kezelésekre adott válaszok értelmezéséhez és az adaptációs mechanizmusok feltárásához természetesen további vizsgálatokat kell végezni. Azonban adataink azt sugallják, hogy a kimutatott metabolikus heterogenitás (a magas mTORC2 komplex aktivitás, a Rictor, p-Akt, p-S6, CPT1A és LDHA enzimek fokozott expressziója gliomák esetén), több enzime nagyon ígéretes kombinációs célpont lehet. A személyre szabott terápiákhoz még több vizsgálatra van szükség: karakterizálni kell a metabolikus folyamatokat nagy beteg populáción a betegség klinikai és terápiás adatainak függvényében, tanulmányozni kell az *in vivo* hatásait potenciális kombinációknak és sok új vagy már ismert metabolikus off-target hatású gyógyszernek, amelyek mellékhatás profilja akár még kedvezőbb is lehet.

5.2 Humán emlődaganatok mTOR és metabolikus aktivitás jellemzése és ennek jelentősége

Munkánkban vizsgált 10 - a különböző emlő daganat szubtypusokat reprezentáló - sejtvonalban a legtöbb monoterápiás, metabolikus gátló kezelés (a glikolízis gátlók kivételével) önmagában mérsékelt anti-proliferatív hatást mutatott. Ez is alátámasztja az

emlő carcinoma sejtek jelentős alkalmazkodóképességét és túlélési/növekedési potenciálját. A sejtek alkalmazkodó képességének alapját és szubtípus független karakterét a vizsgált mTOR aktivitás és metabolikus alkalmazkodás háttérében kimutatott útvonalak elérhetősége is alátámasztotta. A megfelelő enzimek jelentős expressziót mutattak a vizsgált sejtekben.

Az *in vitro* használt glikolitikus inhibitor (3BP) intenzív hatása inkább a sejttenyészetek *in vitro* glükózfüggőségével korrelált, amely nem feltétlenül minden emlődaganat sejt *in vivo* tulajdonsága (pl. a PET-CT negatív esetek (299)). Az LDHA (Warburg-effektus) vagy az LDHB (reverz Warburg) enzimek expressziója egyéni különbségeket mutatott, ezek az egyik leginkább Warburg glikolízist jellemző markerek. Normoxiás sejttenyésztési körülmények között a sejt kultúra proliferációs aktivitásával párhuzamosan megfigyeltük az extracelluláris savasodást, annak ellenére jelenik meg ez a pszeudohipoxiás laktát termelés, hogy a sejtekben az LDHA és B expresszió alapján laktát felhasználás és termelési mechanizmus is rendelkezésre áll a sejt energia szükségleteinek kielégítéséhez. Általános megfigyelés, hogy a növekvő mennyiségű laktát és savasodás a legtöbb sejttenyészetben, beleértve a vizsgált emlő carcinomákat is az intenzív proliferáció jele. Ezek az eredmények megerősítik a Warburg-effektus már ismert bioenergetikai hozzájárulását a daganatok növekedési potenciáljához, amelyet számos emlődaganatokkal kapcsolatos közleményben a rossz prognózissal, a rosszabb prognózisú szubtípusokkal hoznak összefüggésbe (300, 301). IHC-eredményeink - az alacsonyabb esetszám ellenére – is rávilágíthatnak a Warburg-effektus prognosztikai jelentőségére, a magasabb LDHA H-score összefüggést mutatott HR státusszal és a szubtípuseloszlással, de a teljes vizsgált beteg anyagban is összefüggést mutatott a magas LDHA H-score a rossz prognózissal és rövidebb túléléssel (96 hónapos követés időszak DMSF-ben és OS-ben). Az elmúlt évtizedben a Warburg-effektus gátlása és/vagy a glikolízis - ideértve a monokarboxilát-transzportereket is - a tumorokkal kapcsolatos tanulmányok középpontjában állt. A várt siker azonban elmaradt (néhány vizsgálat kivételével) a vizsgált szerek hatástalansága (metabolikus alkalmazkodási mechanizmus) vagy mellékhatás/toxicitása miatt (302).

A célzott mTOR-gátló terápiák hatásai sokfélék lehetnek, daganatellenes tulajdonságait már egyes emlődaganatok kezelésében is kihasználják, bár a mellékhatások gyakran gátat szabnak a kezelésnek. A rapalógokat az exemestane

kombinációk részeként vezették be az előrehaladott esetekben; és a jelenleg elérhető fáziskísérletek eredményei felhívják a figyelmet az mTOR-gátlók esetleges hatékony alkalmazására más altípusokban is, mint például HER2+ vagy TN emlődaganatok (303, 304). Bizonyos ellentmondások találhatók az mTOR, p-mTOR és más mTOR aktivitási markerek értékelésében és prognosztikai jelentőségében, a különféle munkákban (305, 306). *In situ* megállapításaink összhangban vannak azzal a megfigyeléssel, hogy korreláció van a magas mTORC1 aktivitás (p-S6) és a rosszabb prognózis, a rövidebb túlélés között. A p-S6 magas expressziója független kockázati tényező lehet emlődaganatokban, ez a megfigyelés rávilágíthat az mTORC1 hiperaktivitás fontosságára minden altípusban. Az *in vitro* kezelési eredményeink és az általánosan magas Rictor expresszió a sejtvonalakban, a normál és a rosszindulatú emlőszövetekben is arra utalnak, hogy megfontolandó az mTORC2 aktivitás gátlás jelentősége, az mTORC1/C2 gátlók vagy dual-inhibitorok bevezetése az emlő carcinomák terápiájába. Ezek tesztelését már elkezdték a legkülönbözőbb daganatokban és már folyamatban vannak a fáziskísérletek. A mellékhatások azonban itt is gyakoriak, viszont kezelhetők lehetnek; és a végső eredmények ígéretesnek tűnnek (307-309). Ezek a tanulmányok jó (még jobb) biomarkerek kiválasztását és a jelenleg elérhető kombinált terápiák kidolgozását javasolják. Figyelembe véve a rapalógok különféle metabolikus hatásait, illetve potenciális szerepét az mTOR komplexek hatásain keresztül az adaptációban/rezisztencia mechanizmusokban, érdemes más metabolikus inhibitorok mTOR inhibitor kombinációját a tumornövekedésgátlásban tesztelni. Ezen kívül fontos az mTORC1/C2 komplex aktivitásának vizsgálatát és célpontként validálását a terápia előtt elvégezni.

A rosszindulatú daganatok (például gliomák és hepatocelluláris carcinomák) más kísérleti eredményei is azt mutatják, hogy az OXPHOS/mitokondriális biogenezis vagy glikolitikus gátlóknak fokozott daganatellenes hatása van rapalógokkal kombinációban (259, 310). További lehetőségek lehetnek az autofágia, a lipid-oxidáció/-szintézis vagy más OXPHOS-gátlók tesztelése a legújabb célzott terápiák kombinálásával. Ezeket a lehetőségeket sikeresen tesztelték más rosszindulatú daganatokban is (99, 311, 312). Ennek és a sejtek metabolikus állapotának jelentőségét a legtöbb epidemiológiai vizsgálat is alátámasztja az emlődaganatok esetében, pl. a metformin kezelés csökkenti, míg az elhízás és az inzulinrezisztencia növeli a daganatok előfordulás gyakoriságát (313, 314).

Célzott terápiában a glutaminolízist és a lipid anyagcserét, mint potenciális célpontot is figyelembe kell venni, ezek az anyagcsere útvonalak is alternatív szubsztrát, energia hozzáférést biztosíthatnak a sejteknek. A glutamin kétirányú bioenergetikai felhasználásának folyamata (oxidáció vagy redukív karboxiláció) hozzájárul a magas alkalmazkodási képességhez, amelyet számos rosszindulatú daganatban leírtak (315-317). A glutamint glutamáttá átalakító enzimek, a glutaminázok (GLS, GLS2 izotípusok és izoformáik) fontos szabályozó szerepet játszhatnak a metabolikus adaptációban (317). A GLS izoformák szabályozási szerepe eltérő lehet, és expressziós mintázatuk is sejttípus függő, így tumortípus függő is lehet. Az kisebb molekulatömegű CAG izoformához kapcsolódó funkciók az irodalom alapján tumorigenikus potenciállal bírnak, de a másik izoforma nem (318). Vizsgálatainkban, a legtöbb esetben a fokozott GLS fehérje expressziót detektáltuk, de *in situ* nem tudtuk megkülönböztetni az izoformákat (ilyen antitest nem állt rendelkezésünkre). Megállapításunk, miszerint a magas GLS H-score inverz korrelációt mutat a vizsgált betegek prognózisával, ezért többféleképpen is értelmezhető, mert a vizsgálatban nem tudtuk elkülöníteni az izoformákat, így ez a másik izoforma fokozott expresszióját is jelentheti. Így saját és mások által megfigyelt *in situ* magas GLS expresszió nem biztos, hogy ellentmond az *in vitro* tapasztalt GLS gátlók alacsony hatékonyságának. A glutamin forrású TCA-ciklus feltöltést vagy az acetyl-CoA (Ac-CoA) előállítását számos, gyorsan reaktiválódó útvonal segítheti elő sejttípustól és szöveti környezettől függően, különösen a tumorsejtekben (319). Ezek egyike a lipid anyagcsere; mind a lipolitikus, mind a liposzintetikus enzimek jelen vannak az *in vitro* jól proliferáló emlő carcinoma sejtvonalakban. Megállapításaink, IHC vizsgálataink alapján ez a tulajdonság az *in situ* növekvő emlő daganatsejtekre is jellemző altípustól függetlenül. A CPT1A és a FASN jelentős mennyisége megfigyelhető volt a sejtek metabolikus alkalmazkodásának jeleként a vizsgált humán esetek többségében is. A lipid metabolizmus adaptációs mechanizmusainak fontosságával lehet összefüggésben, hogy az esetek 2/3-ban egyidejűleg mutattuk ki a CPT1A és FASN fehérjék nagy mennyiségét ugyanazokban a sejtekben, ugyanazon tumor területeken (mintázat egyezés). A CPT1A relatív magasabb H-score értéke és a FASN relatív alacsonyabb H-score értéke összefüggött az esetek rosszabb túlélésével (Kaplan-Meier-görbék), rosszabb prognózisával. A hosszú láncú zsírsavak potenciálisan magas mitokondriális transzferje támogathatja a rosszindulatú tumorsejt klónok túlélését, és ezek jelenléte a szövetben

eredményeink alapján előre jelezheti a rosszabb prognózist. Előbbivel összefüggenek azok a lipid anyagcsere változások, amelyek szerint a sejtek akár külső forrásból igénybe vehető zsírsav felvétele korrelál rezisztencia mechanizmusokkal. Lapatinib-rezisztens sejtekben emelkedett a CD36 (FA transzporter) expressziót és fokozott exogén FA felvételt, felhasználást írtak le (320). Ez, adatainkhoz hasonlóan kiemeli a lipid-anyagcsere változásainak fontos szerepét emlődaganatok progressziójában.

Egy-egy anyagcsere mechanizmus gátlása önmagában szinte biztos nem elég hatékony (kivétel, ha valamilyen genetikai vagy egyéb okból attól kizárólagosan függ az adott tumorsejt), ezek kombinációja azonban egymással vagy más célzott terápiákkal eredményesebbé tehetik a jövőbeni kezeléseket. Például a rapamycin szinergizálhat FASN-gátlókkal, citotoxikus hatásúak lehetnek ER/HER+ emlő carcinoma sejtekben (321). Vagy, ahogy saját vizsgálataink mutatják a rapamacin+doxycycline kezelés hatékonyan gátolja a tumornövekedést a ZR75.1 HER2+ sejtekben nemcsak *in vitro*, hanem *in vivo* is, ami megerősíti a gliomák esetében tapasztaltakat, amely szerint többféle metabolikus útvonal gátlása rendkívül hatásos lehet. A daganat őssejt, mint kiújuló daganat potenciális forrása elképzelés ezen sejtek fontos tulajdonságának tartják a lipid-oxidáció és a szintézis közötti váltást, ami így potenciális terápiás célpont lehet (64, 322). Új lehetőség az OXPHOS mechanizmusok gátlásának megfontolása a dormant (nyugvó), őssejt-szerű, kemorezisztens sejtek támadása esetében. A legújabb eredmények és teóriák szerint metabolikusan plasztikus tumorsejtek, nevezzük őket nyugvó tumorsejteknek, epitheliális-mesenchymális transzformációra képes vagy daganat őssejtek, több adaptációs mechanizmust hordoznak, de ezeket támadva ezek lehetnek a daganatok „Achilles sarkai” (323, 324).

Új eredményeink hangsúlyozzák, hogy a metabolikus plaszticitás, a metabolikus hibrid fenotípusok jelenléte kulcsszerepet játszik a terápia rezisztencia kialakításában (83, 325). Munkánk újdonsága, hogy több anyagcsere folyamatot és a szövetek ezekkel összefüggő heterogenitását vizsgáltuk egyszerre. Eredményeink szerint a multiplex metabolikus átrarendeződés képessége mTOR hiperaktivitás mellett emlődaganatokban szubtípus függetlenül rossz prognosztikai jel. Előbbi mechanizmusok feltérképezése után talán lesz esély egyénre szabott hatékonyabb terápiák tervezésére a jelenleg még rossz prognózisú emlődaganatos betegek esetében.

Megállapításaink, amelyek szerint az mTOR aktivitás vagy más metabolikus tényezők jellemzése segíthet a tumoros betegségek, így a nagyon rossz prognózisú glioblastomák és a rossz prognózisú emlődaganatok progressziójának előrejelzésében, hangsúlyozzák a munkában is érintett metabolikus átrendeződési mechanizmusok fontosságát. Előbbiek mellett eredményeink felvetik potenciális metabolikus gátlószer kombinációk felhasználásának jelentőségét más terápia rezisztens daganatok standard kezelésében is.

6 Következtetések

I. Humán glioma szövetek és sejtvonalak mTOR aktivitásával és metabolikus jellegzetességeivel kapcsolatos eredmények

1. Jellemezve a humán gliomák mTOR aktivitását a normál agyszövet alacsonyabb mTOR aktivitásához képest a gliomák jelenlegi kezelése melletti rosszabb progresszióval összefüggő mTORC1 és mTORC2 komplex aktivitás emelkedést figyeltünk meg. IDH mutáns gliomákban mérsékelten emelkedett, míg az IDH vad típusú gliomákban jelentősen fokozott mTOR aktivitást írtunk le.
2. Az mTOR aktivitásokkal párhuzamosan a CPT1A és ACCSS2 fehérjék szöveti mennyisége is emelkedett a gliomákban, előbbieket mellett az IDH vad típusú szövetekben jelentős általános metabolikus enzim expresszió emelkedést tapasztaltunk. Ezek az eredmények a high grade gliomák nagyfokú bioenergetikai alkalmazkodó képességére és a glükóz mellett egyéb tápanyaghasznosítási útvonalak jelentőségére hívják fel a figyelmet.
3. A glioma sejtvonalak monoterápiás temozolomide, mTOR inhibitor és egyéb metabolikus gátlószer kezeléseket megfigyelt alacsony érzékenysége összefügg az *in vitro* kezelések eredményeként kimutatható metabolikus enzim expresszió változásokkal (metabolikus plaszticitás) és az mTOR komplexek közötti aktivitás átrendezésekkel, mTORC2 irányú aktivitás eltolódással.
4. Egyszerre több gátlószer, anti-metabolikus kezelés kombinációk, az előbbi metabolikus átrendeződéseket meggátolva jelentősen fokozzák a tumornövekedést gátló hatásokat glioma sejtvonalakban. A temozolomide+rapamycin mellett más rapamycin+antimetabolikus gátlószer kombinációk (pl. rapamycin+doxycycline vagy rapamycin+chloroquine kezelések) komplex additív, szinergista hatásai jelentősen növelik a tumornövekedés gátló hatásokat, növelhetik a jelenlegi kezelések hatékonyságát.

II. *Különböző szubtypusú emlődaganat sejtvonalak és humán biopsziás minták mTOR és metabolikus jellemzésével kapcsolatos eredmények*

1. A vizsgált emlődaganat sejtvonalakat egyedi, szubtypustól független mTOR aktivitás és metabolikus enzim expresszió és ezzel összefüggő *in vitro* inhibitor érzékenység különbségek jellemzik
2. A vizsgált sejtvonalak metabolikus enzim expressziós profilja és intracelluláris metabolit koncentrációi alapján a Warburg fenotípus jobb prognózisú szubtypusokban is lehet jellemző, nemcsak a tripla negatív szubtypusban.
3. *In vitro* vizsgálataink alapján kiválasztott 6 IHC festés (p-S6, Rictor, GLS, LDHA, CPT1A, FASN) segítségével az emlődaganatok mTOR aktivitása és metabolikus plaszticitása alapján:
 - a. A magas mTOR aktivitással összefüggő magas p-S6 H-score érték szubtypustól független összefüggést mutat a betegek rövidebb metasztázis mentes és hosszútávú túlélésével.
 - b. A Warburg glikolízissel összefüggő magasabb LDHA expresszió jellegzetesebb a HR-szubtypusokban.
 - c. Az emlődaganatos betegek túlélési adatainak elemzése alapján a magas CPT1A expresszió a rosszabb, míg a magas FASN expresszió a jobb prognózissal függ össze
 - d. A jellemzésünk segítségével kialakított magas metabolikus plaszticitás (magas mTOR aktivitás mellett legalább két másik vizsgált metabolikus enzim fokozott termelése a tumorszövetben) értékelés és a rosszabb túlélés között összefüggést mutattunk ki. A vizsgált 6 festés együttes értékelése segítheti a szubtypus alapján jó prognózisú HR+ emlő daganatok esetében a szorosabb követést igénylő betegek meghatározását vagy jövőbeni terápiájuk, a relapszust követő kezelés átgondolását.

7 Összefoglalás

A szöveti heterogenitás és a tumorban a mikrokörnyezet, vagy kezelés hatására bekövetkező változások fontos tényezői a daganatos progressziónak. A tumornövekedésben nélkülözhetetlenek a proliferációt, túlélést biztosító folyamatok bioenergetikai hátterének biztosításához szükséges metabolikus változások. A terápia során megjelenő rezisztenciamechanizmusok megértéséhez a tumorheterogenitás genetikai jellegzetességeinek vizsgálata mellett a daganatok anyagcsere változásainak megismerése is szükséges.

Munkámban humán glioma és emlődaganat sejtvonalak metabolikus tulajdonságait és inhibitor érzékenységét tanulmányoztuk. mTOR és metabolikus gátlószerek, illetve kombinációik tumornövekedés gátló hatásait teszteltük *in vitro* és xenograft modellekben is. Az mTOR és anyagcsere aktivitással kapcsolatos fehérjék mennyiségét, változásait Western blot/WES Simple vizsgálatokkal határoztuk meg. Humán biopsziás mintákban metabolikus és mTOR aktivitással összefüggő fehérjék immunhisztokémiai kimutatását értékelve vizsgáltuk az expressziós változások klinikai, prognosztikai jelentőségét.

A gliomákban a rosszabb prognózisú esetek magasabb mTOR, mTORC2 aktivitását figyeltük meg. Az mTOR aktivitásokkal párhuzamosan a CPT1A és ACSS2 fehérjék szöveti mennyisége is emelkedett klinikai mintákban. Az IDH vad típusú gliomákban jelentős általános metabolikus enzim expresszió emelkedést tapasztaltunk. Az mTOR és metabolikus gátlószerek, illetve ezek kombinációi szignifikáns proliferáció csökkenést eredményeztek glioma sejtenyészetekben. Továbbá az mTOR inhibitor kombinált antimetabolikus kezelések jelentős emlődaganat növekedésgátló hatást mutattak *in vivo* is. Emlődaganatokban az mTOR aktivitás és más metabolikus útvonalakat jellemző markerek segítségével igazoltuk, hogy a daganat szubtypusától függetlenül a metabolikus plaszticitás a rosszabb túléléssel összefüggést mutat.

Ezek az eredmények a high grade gliomák és a rossz prognózisú emlődaganatok nagyfokú bioenergetikai alkalmazkodó képességére és a glükóz mellett további - terápiais targetként is felhasználható - tápanyaghasznosítási útvonal jelentőségére hívják fel a figyelmet. A munkánkban beállított mTOR és metabolikus aktivitást szabályozó fehérjéket kimutató, immunhisztokémiai panelek alkalmasak lehetnek a metabolikus plaszticitás feltérképezéséhez más tumorokban is.

8 Summary

Tissue heterogeneity and adaptation to microenvironmental or therapy related alterations are important factors in tumor progression. For tumor growth, metabolic changes are essential to support the bioenergetic background of cellular proliferation and survival potential. To understand the developing resistance mechanisms, not only the genetic features of tumour heterogeneity, but the metabolic alterations of neoplastic cells have to be studied.

In our work, we investigated the metabolic characteristics and the inhibitor sensitivity of human glioma and breast cancer cell lines. The anti-proliferative effects of mTOR and metabolic inhibitors were tested both in monotherapy and in combinations using *in vitro* and *in vivo* xenograft models. Quantitative analyses of mTOR and other metabolic proteins were performed using Western blot/WES Simple methods. By evaluating the immunohistochemical detection of mTOR and metabolic activity-related proteins, we investigated their clinical and prognostic significance in human biopsies.

In gliomas, we observed that elevated mTOR (mTORC2) activity correlated with worse prognosis. In parallel with mTOR activity, the amount of CPT1A and ACSS2 was also elevated in clinical tissue specimens. A considerable increase of metabolic enzyme expression was detected in IDH wild type cases compared either to normal cerebellum or IDH mutant cases. Significant anti-proliferative effects were observed in glioma cell lines using mTOR and metabolic inhibitors both in mono- or combination therapies. The combination of mTOR targeting and anti-metabolic drugs also resulted in significant proliferation inhibition in xenografted LumB breast cancer. By detecting markers characteristic for mTOR activity and metabolic signalling, we confirmed that metabolic plasticity can be associated with worse prognosis in breast cancer independently of subtypes.

These findings highlight that beside glucose consumption other nutrient intermediates can also be utilized by high-grade gliomas and aggressive breast cancers. Moreover, our results underline that this high bioenergetic adaptation capacity of cancers therapeutically may also be targeted. Our immunohistochemical panels detecting mTOR and other metabolism regulating proteins may allow detailed characterisations of metabolic plasticity also in other malignant tumor types.

9 Irodalomjegyzék

1. Wishart SD, Mandal R, Stanislaus A, Ramirez-Gaona M. (2016) Cancer Metabolomics and the Human Metabolome Database. *Metabolites*, 6.
2. Ward Patrick S, Thompson Craig B. (2012) Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. *Cancer Cell*, 21: 297-308.
3. Hanahan D, Weinberg Robert A. (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144: 646-674.
4. Pavlova Natalya N, Thompson Craig B. (2016) The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism*, 23: 27-47.
5. Cantor JR, Sabatini DM. (2012) Cancer Cell Metabolism: One Hallmark, Many Faces. *Cancer Discovery*, 2: 881.
6. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324: 1029-1033.
7. Pfeiffer T, Schuster S, Bonhoeffer S. (2001) Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science*, 292: 504-507.
8. Martinez-Outschoorn UE, Lisanti MP, Sotgia F. (2014) Catabolic cancer-associated fibroblasts transfer energy and biomass to anabolic cancer cells, fueling tumor growth. *Semin Cancer Biol*, 25: 47-60.
9. Sonveaux P, Végran F, Schroeder T, Wergin MC, Verrax J, Rabbani ZN, De Saedeleer 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. *The Journal of clinical investigation*, 118: 3930-3942.
10. Gonzalez CD, Alvarez S, Ropolo A, Rosenzvit C, Bagnes MF, Vaccaro MI. (2014) Autophagy, Warburg, and Warburg reverse effects in human cancer. *Biomed Res Int*, 2014: 926729.
11. Pietrocola F, Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Madeo F, Kroemer G. (2015) Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger. *Cell Metab*, 21: 805-821.
12. Warburg O, Wind F, Negelein E. (1927) THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *The Journal of general physiology*, 8: 519-530.

13. Liberti MV, Locasale JW. (2016) The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci*, 41: 211-218.
14. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. (2008) The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab*, 7: 11-20.
15. Marchiq I, Le Floch R, Roux D, Simon MP, Pouyssegur J. (2015) Genetic disruption of lactate/H⁺ symporters (MCTs) and their subunit CD147/BASIGIN sensitizes glycolytic tumor cells to phenformin. *Cancer Res*, 75: 171-180.
16. Sui G, Affar el B, Shi Y, Brignone C, Wall NR, Yin P, Donohoe M, Luke MP, Calvo D, Grossman SR, Shi Y. (2004) Yin Yang 1 is a negative regulator of p53. *Cell*, 117: 859-872.
17. Jeon SM, Chandel NS, Hay N. (2012) AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature*, 485: 661-665.
18. Gonzalez-Menendez P, Hevia D, Alonso-Arias R, Alvarez-Artime A, Rodriguez-Garcia A, Kinet S, Gonzalez-Pola I, Taylor N, Mayo JC, Sainz RM. (2018) GLUT1 protects prostate cancer cells from glucose deprivation-induced oxidative stress. *Redox Biol*, 17: 112-127.
19. Desai S, Ding M, Wang B, Lu Z, Zhao Q, Shaw K, Yung WK, Weinstein JN, Tan M, Yao J. (2014) Tissue-specific isoform switch and DNA hypomethylation of the pyruvate kinase PKM gene in human cancers. *Oncotarget*, 5: 8202-8210.
20. Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu CS, Dang G, Jungmann RA, Dalla-Favera R, Dang CV. (1997) c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 6658-6663.
21. DeBerardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB. (2008) Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Current Opinion in Genetics & Development*, 18: 54-61.
22. Siebeneicher H, Bauser M, Buchmann B, Heisler I, Muller T, Neuhaus R, Rehwinkel H, Telser J, Zorn L. (2016) Identification of novel GLUT inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 26: 1732-1737.
23. DeBerardinis RJ, Cheng T. (2010) Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene*, 29: 313-324.

24. Katt WP, Lukey MJ, Cerione RA. (2017) A tale of two glutaminases: homologous enzymes with distinct roles in tumorigenesis. *Future Med Chem*, 9: 223-243.
25. Szeliga M, Bogacińska-Karaś M, Różycka A, Hilgier W, Marquez J, Albrecht J. (2014) Silencing of GLS and overexpression of GLS2 genes cooperate in decreasing the proliferation and viability of glioblastoma cells. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35: 1855-1862.
26. Suzuki S, Tanaka T, Poyurovsky MV, Nagano H, Mayama T, Ohkubo S, Lokshin M, Hosokawa H, Nakayama T, Suzuki Y, Sugano S, Sato E, Nagao T, Yokote K, Tatsuno I, Prives C. (2010) Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 7461-7466.
27. Saha SK, Islam SMR, Abdullah-Al-Wadud M, Islam S, Ali F, Park KS. (2019) Multiomics Analysis Reveals that GLS and GLS2 Differentially Modulate the Clinical Outcomes of Cancer. *Journal of clinical medicine*, 8: 355.
28. Kim JY, Heo S-H, Choi SK, Song IH, Park IA, Kim Y-A, Park HS, Park SY, Bang WS, Gong G, Lee HJ. (2017) Glutaminase expression is a poor prognostic factor in node-positive triple-negative breast cancer patients with a high level of tumor-infiltrating lymphocytes. *Virchows Archiv*, 470: 381-389.
29. Zhang C, Liu J, Zhao Y, Yue X, Zhu Y, Wang X, Wu H, Blanco F, Li S, Bhanot G, Haffty BG, Hu W, Feng Z. (2016) Glutaminase 2 is a novel negative regulator of small GTPase Rac1 and mediates p53 function in suppressing metastasis. *Elife*, 5: e10727.
30. Hoerner CR, Chen VJ, Fan AC. (2019) The 'Achilles Heel' of Metabolism in Renal Cell Carcinoma: Glutaminase Inhibition as a Rational Treatment Strategy. *Kidney Cancer*, 3: 15-29.
31. Boroughs LK, DeBerardinis RJ. (2015) Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nat Cell Biol*, 17: 351-359.
32. Hensley CT, Wasti AT, DeBerardinis RJ. (2013) Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *J Clin Invest*, 123: 3678-3684.

33. Vučetić M, Cormerais Y, Parks SK, Pouysségur J. (2017) The Central Role of Amino Acids in Cancer Redox Homeostasis: Vulnerability Points of the Cancer Redox Code. *Frontiers in Oncology*, 7.
34. Masisi BK, El Ansari R, Alfarsi L, Rakha EA, Green AR, Craze ML. (2019) The Role of Glutaminase in Cancer. *Histopathology*.
35. Warburg O. (1956) On the origin of cancer cells. *Science*, 123: 309-314.
36. Calabrese C, Iommarini L, Kurelac I, Calvaruso MA, Capristo M, Lollini P-L, Nanni P, Bergamini C, Nicoletti G, De Giovanni C, Ghelli A, Giorgio V, Caratozzolo MF, Marzano F, Manzari C, Betts CM, Carelli V, Ceccarelli C, Attimonelli M, Romeo G, Fato R, Rugolo M, Tullo A, Gasparre G, Porcelli AM. (2013) Respiratory complex I is essential to induce a Warburg profile in mitochondria-defective tumor cells. *Cancer & Metabolism*, 1: 11.
37. Hall A, Meyle KD, Lange MK, Klima M, Sanderhoff M, Dahl C, Abildgaard C, Thorup K, Moghimi SM, Jensen PB, Bartek J, Guldborg P, Christensen C. (2013) Dysfunctional oxidative phosphorylation makes malignant melanoma cells addicted to glycolysis driven by the V600EBRAF oncogene. *Oncotarget*, 4.
38. Costello LC, Franklin RB. (2013) A review of the important central role of altered citrate metabolism during the process of stem cell differentiation. *Journal of regenerative medicine & tissue engineering*, 2: 1.
39. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, Thompson CB. (2007) Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 19345.
40. Taylor RW, Turnbull DM. (2005) Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet*, 6: 389-402.
41. Carracedo A, Cantley LC, Pandolfi PP. (2013) Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nature Reviews Cancer*, 13: 227-232.
42. Kolwicz SC, Jr., Purohit S, Tian R. (2013) Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ Res*, 113: 603-616.

43. Yang Y, Karakhanova S, Hartwig W, D'Haese JG, Philippov PP, Werner J, Bazhin AV. (2016) Mitochondria and Mitochondrial ROS in Cancer: Novel Targets for Anticancer Therapy. *J Cell Physiol*, 231: 2570-2581.
44. Beutner G, Alavian KN, Jonas EA, Porter GA. The Mitochondrial Permeability Transition Pore and ATP Synthase. In: H Singh, S-S Sheu (szerk.), *Pharmacology of Mitochondria*. Springer International Publishing, Cham, 2017: 21-46.
45. Singh KK, Desouki MM, Franklin RB, Costello LC. (2006) Mitochondrial aconitase and citrate metabolism in malignant and nonmalignant human prostate tissues. *Mol Cancer*, 5: 14.
46. Tomlinson IP, Alam NA, Rowan AJ, Barclay E, Jaeger EE, Kelsell D, Leigh I, Gorman P, Lamlum H, Rahman S, Roylance RR, Olpin S, Bevan S, Barker K, Hearle N, Houlston RS, Kiuru M, Lehtonen R, Karhu A, Vilkki S, Laiho P, Eklund C, Vierimaa O, Aittomaki K, Hietala M, Sistonen P, Paetau A, Salovaara R, Herva R, Launonen V, Aaltonen LA. (2002) Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat Genet*, 30: 406-410.
47. Bardella C, Pollard PJ, Tomlinson I. (2011) SDH mutations in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1807: 1432-1443.
48. Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A. (2008) Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol*, 116: 597-602.
49. Sancho P, Barneda D, Heeschen C. (2016) Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *Br J Cancer*, 114: 1305-1312.
50. Lee KM, Giltnane JM, Balko JM, Schwarz LJ, Guerrero-Zotano AL, Hutchinson KE, Nixon MJ, Estrada MV, Sanchez V, Sanders ME, Lee T, Gomez H, Lluch A, Perez-Fidalgo JA, Wolf MM, Andrejeva G, Rathmell JC, Fesik SW, Arteaga CL. (2017) MYC and MCL1 Cooperatively Promote Chemotherapy-Resistant Breast Cancer Stem Cells via Regulation of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. *Cell Metab*, 26: 633-647.e637.
51. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9: 112-124.

52. Lodhi IJ, Wei X, Semenkovich CF. (2011) Lipoexpediency: de novo lipogenesis as a metabolic signal transmitter. *Trends Endocrinol Metab*, 22: 1-8.
53. Baenke F, Peck B, Miess H, Schulze A. (2013) Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Dis Model Mech*, 6: 1353-1363.
54. Cruz PM, Mo H, McConathy WJ, Sabnis N, Lacko AG. (2013) The role of cholesterol metabolism and cholesterol transport in carcinogenesis: a review of scientific findings, relevant to future cancer therapeutics. *Front Pharmacol*, 4: 119.
55. Ackerman D, Simon MC. (2014) Hypoxia, lipids, and cancer: surviving the harsh tumor microenvironment. *Trends Cell Biol*, 24: 472-478.
56. Cheng C, Geng F, Cheng X, Guo D. (2018) Lipid metabolism reprogramming and its potential targets in cancer. *Cancer Commun (Lond)*, 38: 27.
57. Vriens K, Christen S, Parik S, Broekaert D, Yoshinaga K, Talebi A, Dehairs J, Escalona-Noguero C, Schmieder R, Cornfield T, Charlton C, Romero-Perez L, Rossi M, Rinaldi G, Orth MF, Boon R, Kerstens A, Kwan SY, Faubert B, Mendez-Lucas A, Kopitz CC, Chen T, Fernandez-Garcia J, Duarte JAG, Schmitz AA, Steigemann P, Najimi M, Hagebarth A, Van Ginderachter JA, Sokal E, Gotoh N, Wong KK, Verfaillie C, Derua R, Munck S, Yuneva M, Beretta L, DeBerardinis RJ, Swinnen JV, Hodson L, Cassiman D, Verslype C, Christian S, Grunewald S, Grunewald TGP, Fendt SM. (2019) Evidence for an alternative fatty acid desaturation pathway increasing cancer plasticity. *Nature*, 566: 403-406.
58. Wahlstrom T, Henriksson MA. (2015) Impact of MYC in regulation of tumor cell metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1849: 563-569.
59. Senni N, Savall M, Cabrerizo Granados D, Alves-Guerra MC, Sartor C, Lagoutte I, Gougelet A, Terris B, Gilgenkrantz H, Perret C, Colnot S, Bossard P. (2019) beta-catenin-activated hepatocellular carcinomas are addicted to fatty acids. *Gut*, 68: 322-334.
60. Han L, Liu J, Zhu L, Tan F, Qin Y, Huang H, Yu Y. (2018) Free fatty acid can induce cardiac dysfunction and alter insulin signaling pathways in the heart. *Lipids Health Dis*, 17: 185.

61. Cucchi D, Camacho-Munoz D, Certo M, Pucino V, Nicolaou A, Mauro C. (2019) Fatty acids - from energy substrates to key regulators of cell survival, proliferation and effector function. *Cell Stress*, 4: 9-23.
62. Svensson RU, Parker SJ, Eichner LJ, Kolar MJ, Wallace M, Brun SN, Lombardo PS, Van Nostrand JL, Hutchins A, Vera L, Gerken L, Greenwood J, Bhat S, Harriman G, Westlin WF, Harwood HJ, Jr., Saghatelian A, Kapeller R, Metallo CM, Shaw RJ. (2016) Inhibition of acetyl-CoA carboxylase suppresses fatty acid synthesis and tumor growth of non-small-cell lung cancer in preclinical models. *Nat Med*, 22: 1108-1119.
63. Melone MAB, Valentino A, Margarucci S, Galderisi U, Giordano A, Peluso G. (2018) The carnitine system and cancer metabolic plasticity. *Cell death & disease*, 9: 228-228.
64. Chen M, Huang J. (2019) The expanded role of fatty acid metabolism in cancer: new aspects and targets. *Precis Clin Med*, 2: 183-191.
65. Jia D, Park JH, Jung KH, Levine H, Kaiparettu BA. (2018) Elucidating the Metabolic Plasticity of Cancer: Mitochondrial Reprogramming and Hybrid Metabolic States. *Cells*, 7: 21.
66. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. (2017) Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*, 168: 670-691.
67. Osthus RC, Shim H, Kim S, Li Q, Reddy R, Mukherjee M, Xu Y, Wonsey D, Lee LA, Dang CV. (2000) Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem*, 275: 21797-21800.
68. Basu S, Gnanapradeepan K, Barnoud T, Kung C-P, Tavecchio M, Scott J, Watters A, Chen Q, Kossenkov AV, Murphy ME. (2018) Mutant p53 controls tumor metabolism and metastasis by regulating PGC-1 α . *Genes & development*, 32: 230-243.
69. Saxton RA, Sabatini DM. (2017) mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 168: 960-976.
70. Sears R, Nuckolls F, Haura E, Taya Y, Tamai K, Nevins JR. (2000) Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes & development*, 14: 2501-2514.

71. Masoud GN, Li W. (2015) HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, 5: 378-389.
72. Hardie DG, Alessi DR. (2013) LKB1 and AMPK and the cancer-metabolism link - ten years after. *BMC Biology*, 11: 36.
73. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. (2012) AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13: 251-262.
74. Herzig S, Shaw RJ. (2018) AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19: 121-135.
75. Koo S-H, Flechner L, Qi L, Zhang X, Scretton RA, Jeffries S, Hedrick S, Xu W, Boussouar F, Brindle P, Takemori H, Montminy M. (2005) The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature*, 437: 1109-1114.
76. He G, Zhang YW, Lee JH, Zeng SX, Wang YV, Luo Z, Dong XC, Viollet B, Wahl GM, Lu H. (2014) AMP-activated protein kinase induces p53 by phosphorylating MDMX and inhibiting its activity. *Mol Cell Biol*, 34: 148-157.
77. Yu L, Lu M, Jia D, Ma J, Ben-Jacob E, Levine H, Kaiparettu BA, Onuchic JN. (2017) Modeling the Genetic Regulation of Cancer Metabolism: Interplay between Glycolysis and Oxidative Phosphorylation. *Cancer Research*, 77: 1564.
78. Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J, Li F, Wong STC, Choi H, El Rayes T, Ryu S, Troeger J, Schwabe RF, Vahdat LT, Altorki NK, Mittal V, Gao D. (2015) Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature*, 527: 472-476.
79. Masin M, Vazquez J, Rossi S, Groeneveld S, Samson N, Schwalie PC, Deplancke B, Frawley LE, Gouttenoire J, Moradpour D, Oliver TG, Meylan E. (2014) GLUT3 is induced during epithelial-mesenchymal transition and promotes tumor cell proliferation in non-small cell lung cancer. *Cancer & Metabolism*, 2: 11.
80. Yu J, Li J, Chen Y, Cao W, Lu Y, Yang J, Xing E. (2017) Snail Enhances Glycolysis in the Epithelial-Mesenchymal Transition Process by Targeting FBP1 in Gastric Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 43: 31-38.
81. Nath A, Li I, Roberts LR, Chan C. (2015) Elevated free fatty acid uptake via CD36 promotes epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Sci Rep*, 5: 14752.

82. Anderson M, Marayati R, Moffitt R, Yeh JJ. (2017) Hexokinase 2 promotes tumor growth and metastasis by regulating lactate production in pancreatic cancer. *Oncotarget*, 8: 56081-56094.
83. McGuirk S, Audet-Delage Y, St-Pierre J. (2020) Metabolic Fitness and Plasticity in Cancer Progression. *Trends in Cancer*, 6: 49-61.
84. Cha YJ, Jung WH, Koo JS. (2017) Differential site-based expression of pentose phosphate pathway-related proteins among breast cancer metastases. *Disease markers*, 2017.
85. Lemma S, Di Pompo G, Porporato PE, Sboarina M, Russell S, Gillies RJ, Baldini N, Sonveaux P, Avnet S. (2017) MDA-MB-231 breast cancer cells fuel osteoclast metabolism and activity: A new rationale for the pathogenesis of osteolytic bone metastases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863: 3254-3264.
86. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111: 984.
87. Christen S, Lorendeau D, Schmieder R, Broekaert D, Metzger K, Veys K, Elia I, Buescher Joerg M, Orth Martin F, Davidson Shawn M, Grünwald Thomas Georg P, De Bock K, Fendt S-M. (2016) Breast Cancer-Derived Lung Metastases Show Increased Pyruvate Carboxylase-Dependent Anaplerosis. *Cell Reports*, 17: 837-848.
88. Jagust P, de Luxan-Delgado B, Parejo-Alonso B, Sancho P. (2019) Metabolism-Based Therapeutic Strategies Targeting Cancer Stem Cells. *Front Pharmacol*, 10: 203.
89. Liu Y, Cao Y, Zhang W, Bergmeier S, Qian Y, Akbar H, Colvin R, Ding J, Tong L, Wu S, Hines J, Chen X. (2012) A small-molecule inhibitor of glucose transporter 1 downregulates glycolysis, induces cell-cycle arrest, and inhibits cancer cell growth in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*, 11: 1672-1682.
90. Nath K, Nelson DS, Heitjan DF, Leeper DB, Zhou R, Glickson JD. (2015) Lonidamine induces intracellular tumor acidification and ATP depletion in breast,

- prostate and ovarian cancer xenografts and potentiates response to doxorubicin. *NMR Biomed*, 28: 281-290.
91. Muley P, Olinger A, Tummala H. (2015) 2-Deoxyglucose induces cell cycle arrest and apoptosis in colorectal cancer cells independent of its glycolysis inhibition. *Nutr Cancer*, 67: 514-522.
 92. Rahier NJ, Molinier N, Long C, Deshmukh SK, Kate AS, Ranadive P, Verekar SA, Jiotode M, Lavhale RR, Tokdar P, Balakrishnan A, Meignan S, Robichon C, Gomes B, Aussagues Y, Samson A, Sautel F, Bailly C. (2015) Anticancer activity of koningic acid and semisynthetic derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 23: 3712-3721.
 93. Ko YH, Smith BL, Wang Y, Pomper MG, Rini DA, Torbenson MS, Hullihen J, Pedersen PL. (2004) Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP. *Biochem Biophys Res Commun*, 324: 269-275.
 94. Fan T, Sun G, Sun X, Zhao L, Zhong R, Peng Y. (2019) Tumor Energy Metabolism and Potential of 3-Bromopyruvate as an Inhibitor of Aerobic Glycolysis: Implications in Tumor Treatment. *Cancers (Basel)*, 11.
 95. Chen GQ, Tang CF, Shi XK, Lin CY, Fatima S, Pan XH, Yang DJ, Zhang G, Lu AP, Lin SH, Bian ZX. (2015) Halofuginone inhibits colorectal cancer growth through suppression of Akt/mTORC1 signaling and glucose metabolism. *Oncotarget*, 6: 24148-24162.
 96. Robinson MM, McBryant SJ, Tsukamoto T, Rojas C, Ferraris DV, Hamilton SK, Hansen JC, Curthoys NP. (2007) Novel mechanism of inhibition of rat kidney-type glutaminase by bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide (BPTES). *Biochem J*, 406: 407-414.
 97. Zimmermann SC, Wolf EF, Luu A, Thomas AG, Stathis M, Poore B, Nguyen C, Le A, Rojas C, Slusher BS, Tsukamoto T. (2016) Allosteric Glutaminase Inhibitors Based on a 1,4-Di(5-amino-1,3,4-thiadiazol-2-yl)butane Scaffold. *ACS medicinal chemistry letters*, 7: 520-524.
 98. Yuan L, Sheng X, Clark LH, Zhang L, Guo H, Jones HM, Willson AK, Gehrig PA, Zhou C, Bae-Jump VL. (2016) Glutaminase inhibitor compound 968 inhibits

- cell proliferation and sensitizes paclitaxel in ovarian cancer. *American journal of translational research*, 8: 4265-4277.
99. Kuntz EM, Baquero P, Michie AM, Dunn K, Tardito S, Holyoake TL, Helgason GV, Gottlieb E. (2017) Targeting mitochondrial oxidative phosphorylation eradicates therapy-resistant chronic myeloid leukemia stem cells. *Nat Med*, 23: 1234-1240.
 100. Scatena C, Roncella M, Di Paolo A, Aretini P, Menicagli M, Fanelli G, Marini C, Mazzanti CM, Ghilli M, Sotgia F, Lisanti MP, Naccarato AG. (2018) Doxycycline, an Inhibitor of Mitochondrial Biogenesis, Effectively Reduces Cancer Stem Cells (CSCs) in Early Breast Cancer Patients: A Clinical Pilot Study. *Frontiers in oncology*, 8: 452-452.
 101. Skoda J, Borankova K, Jansson PJ, Huang ML, Veselska R, Richardson DR. (2019) Pharmacological targeting of mitochondria in cancer stem cells: An ancient organelle at the crossroad of novel anti-cancer therapies. *Pharmacol Res*, 139: 298-313.
 102. Hawley SA, Gadalla AE, Olsen GS, Hardie DG. (2002) The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. *Diabetes*, 51: 2420-2425.
 103. Ashton TM, McKenna WG, Kunz-Schughart LA, Higgins GS. (2018) Oxidative Phosphorylation as an Emerging Target in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res*, 24: 2482-2490.
 104. Zhang X, Fryknas M, Hernlund E, Fayad W, De Milito A, Olofsson MH, Gogvadze V, Dang L, Pahlman S, Schughart LA, Rickardson L, D'Arcy P, Gullbo J, Nygren P, Larsson R, Linder S. (2014) Induction of mitochondrial dysfunction as a strategy for targeting tumour cells in metabolically compromised microenvironments. *Nat Commun*, 5: 3295.
 105. Ellinghaus P, Heisler I, Unterschemmann K, Haerter M, Beck H, Greschat S, Ehrmann A, Summer H, Flamme I, Oehme F, Thierauch K, Michels M, Hess-Stumpp H, Ziegelbauer K. (2013) BAY 87-2243, a highly potent and selective inhibitor of hypoxia-induced gene activation has antitumor activities by inhibition of mitochondrial complex I. *Cancer Med*, 2: 611-624.

106. Molina JR, Sun Y, Protopopova M, Gera S, Bandi M, Bristow C, McAfoos T, Morlacchi P, Ackroyd J, Agip AA, Al-Atrash G, Asara J, Bardenhagen J, Carrillo CC, Carroll C, Chang E, Ciurea S, Cross JB, Czako B, Deem A, Daver N, de Groot JF, Dong JW, Feng N, Gao G, Gay J, Do MG, Greer J, Giuliani V, Han J, Han L, Henry VK, Hirst J, Huang S, Jiang Y, Kang Z, Khor T, Konoplev S, Lin YH, Liu G, Lodi A, Lofton T, Ma H, Mahendra M, Matre P, Mullinax R, Peoples M, Petrocchi A, Rodriguez-Canale J, Serreli R, Shi T, Smith M, Tabe Y, Theroff J, Tiziani S, Xu Q, Zhang Q, Muller F, DePinho RA, Toniatti C, Draetta GF, Heffernan TP, Konopleva M, Jones P, Di Francesco ME, Marszalek JR. (2018) An inhibitor of oxidative phosphorylation exploits cancer vulnerability. *Nat Med*, 24: 1036-1046.
107. Diamond JR, Goff B, Forster MD, Bendell JC, Britten CD, Gordon MS, Gabra H, Waterhouse DM, Poole M, Ross Camidge D, Hamilton E, Moore KM. (2017) Phase Ib study of the mitochondrial inhibitor ME-344 plus topotecan in patients with previously treated, locally advanced or metastatic small cell lung, ovarian and cervical cancers. *Invest New Drugs*, 35: 627-633.
108. Lucantoni F, Dussmann H, Llorente-Folch I, Prehn JHM. (2018) BCL2 and BCL(X)L selective inhibitors decrease mitochondrial ATP production in breast cancer cells and are synthetically lethal when combined with 2-deoxy-D-glucose. *Oncotarget*, 9: 26046-26063.
109. Shi Y, Lim SK, Liang Q, Iyer SV, Wang HY, Wang Z, Xie X, Sun D, Chen YJ, Tabar V, Gutin P, Williams N, De Brabander JK, Parada LF. (2019) Gboxin is an oxidative phosphorylation inhibitor that targets glioblastoma. *Nature*, 567: 341-346.
110. Watt MJ, Clark AK, Selth LA, Haynes VR, Lister N, Rebello R, Porter LH, Niranjana B, Whitby ST, Lo J, Huang C, Schittenhelm RB, Anderson KE, Furic L, Wijayarathne PR, Matzaris M, Montgomery MK, Papargiris M, Norden S, Febbraio M, Risbridger GP, Frydenberg M, Nomura DK, Taylor RA. (2019) Suppressing fatty acid uptake has therapeutic effects in preclinical models of prostate cancer. *Science Translational Medicine*, 11: eaau5758.

111. Li X, Chen Y-T, Hu P, Huang W-C. (2014) Fatostatin Displays High Antitumor Activity in Prostate Cancer by Blocking SREBP-Regulated Metabolic Pathways and Androgen Receptor Signaling. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13: 855.
112. Carvalho MA, Zecchin KG, Seguin F, Bastos DC, Agostini M, Rangel ALCA, Veiga SS, Raposo HF, Oliveira HCF, Loda M, Coletta RD, Graner E. (2008) Fatty acid synthase inhibition with Orlistat promotes apoptosis and reduces cell growth and lymph node metastasis in a mouse melanoma model. *International Journal of Cancer*, 123: 2557-2565.
113. Zadra G, Ribeiro CF, Chetta P, Ho Y, Cacciatore S, Gao X, Syamala S, Bango C, Photopoulos C, Huang Y, Tyekucheva S, Bastos DC, Tchaicha J, Lawney B, Uo T, D'Anello L, Csibi A, Kalekar R, Larimer B, Ellis L, Butler LM, Morrissey C, McGovern K, Palombella VJ, Kutok JL, Mahmood U, Bosari S, Adams J, Peluso S, Dehm SM, Plymate SR, Loda M. (2019) Inhibition of de novo lipogenesis targets androgen receptor signaling in castration-resistant prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116: 631.
114. Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB. (2009) ATP-Citrate Lyase Links Cellular Metabolism to Histone Acetylation. *Science*, 324: 1076.
115. Beyaz S, Mana MD, Roper J, Kedrin D, Saadatpour A, Hong S-J, Bauer-Rowe KE, Xifaras ME, Akkad A, Arias E, Pinello L, Katz Y, Shinagare S, Abu-Remaileh M, Mihaylova MM, Lamming DW, Dogum R, Guo G, Bell GW, Selig M, Nielsen GP, Gupta N, Ferrone CR, Deshpande V, Yuan G-C, Orkin SH, Sabatini DM, Yilmaz ÖH. (2016) High-fat diet enhances stemness and tumorigenicity of intestinal progenitors. *Nature*, 531: 53-58.
116. Schlaepfer IR, Rider L, Rodrigues LU, Gijón MA, Pac CT, Romero L, Cimic A, Sirintrapun SJ, Glodé LM, Eckel RH, Cramer SD. (2014) Lipid Catabolism via CPT1 as a Therapeutic Target for Prostate Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13: 2361.
117. Xu R, Ji Z, Xu C, Zhu J. (2018) The clinical value of using chloroquine or hydroxychloroquine as autophagy inhibitors in the treatment of cancers: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 97: e12912.

118. Vitiello GA, Medina BD, Zeng S, Bowler TG, Zhang JQ, Loo JK, Param NJ, Liu M, Moral AJ, Zhao JN, Rossi F, Antonescu CR, Balachandran VP, Cross JR, DeMatteo RP. (2018) Mitochondrial Inhibition Augments the Efficacy of Imatinib by Resetting the Metabolic Phenotype of Gastrointestinal Stromal Tumor. *Clin Cancer Res*, 24: 972-984.
119. Zhang L, Yao Y, Zhang S, Liu Y, Guo H, Ahmed M, Bell T, Zhang H, Han G, Lorence E, Badillo M, Zhou S, Sun Y, Di Francesco ME, Feng N, Haun R, Lan R, Mackintosh SG, Mao X, Song X, Zhang J, Pham LV, Lorenzi PL, Marszalek J, Heffernan T, Draetta G, Jones P, Futreal A, Nomie K, Wang L, Wang M. (2019) Metabolic reprogramming toward oxidative phosphorylation identifies a therapeutic target for mantle cell lymphoma. *Sci Transl Med*, 11.
120. Farge T, Saland E, de Toni F, Aroua N, Hosseini M, Perry R, Bosc C, Sugita M, Stuani L, Fraisse M, Scotland S, Larrue C, Boutzen H, Feliu V, Nicolau-Travers ML, Cassant-Sourdy S, Broin N, David M, Serhan N, Sarry A, Tavitian S, Kaoma T, Vallar L, Iacovoni J, Linares LK, Montersino C, Castellano R, Griessinger E, Collette Y, Duchamp O, Barreira Y, Hirsch P, Palama T, Gales L, Delhommeau F, Garmy-Susini BH, Portais JC, Vergez F, Selak M, Danet-Desnoyers G, Carroll M, Recher C, Sarry JE. (2017) Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discov*, 7: 716-735.
121. Liu GY, Sabatini DM. (2020) mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
122. Sarbassov DD, Ali SM, Kim D-H, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. (2004) Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Current biology*, 14: 1296-1302.
123. Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P, Hall MN. (2002) Two TOR Complexes, Only One of which Is Rapamycin Sensitive, Have Distinct Roles in Cell Growth Control. *Molecular Cell*, 10: 457-468.
124. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur KV, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. (2003) GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-

- sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell*, 11: 895-904.
125. Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, Brown M, Fitzgerald KJ, Sabatini DM. (2006) Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC α , but not S6K1. *Dev Cell*, 11: 859-871.
 126. Hwang Y, Kim LC, Song W, Edwards DN, Cook RS, Chen J. (2019) Disruption of the Scaffolding Function of mLST8 Selectively Inhibits mTORC2 Assembly and Function and Suppresses mTORC2-Dependent Tumor Growth In Vivo. *Cancer Res*, 79: 3178-3184.
 127. 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: 873-886.
 128. Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K. (2002) Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*, 110: 177-189.
 129. Nojima H, Tokunaga C, Eguchi S, Oshiro N, Hidayat S, Yoshino K, Hara K, Tanaka N, Avruch J, Yonezawa K. (2003) The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *J Biol Chem*, 278: 15461-15464.
 130. Vander Haar E, Lee SI, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH. (2007) Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol*, 9: 316-323.
 131. Yang Q, Inoki K, Ikenoue T, Guan KL. (2006) Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity. *Genes Dev*, 20: 2820-2832.
 132. Pearce LR, Huang X, Boudeau J, Pawlowski R, Wullschleger S, Deak M, Ibrahim AF, Gurlay R, Magnuson MA, Alessi DR. (2007) Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem J*, 405: 513-522.

133. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. (2006) Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*, 22: 159-168.
134. Lamming DW, Ye L, Katajisto P, Goncalves MD, Saitoh M, Stevens DM, Davis JG, Salmon AB, Richardson A, Ahima RS, Guertin DA, Sabatini DM, Baur JA. (2012) Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science*, 335: 1638-1643.
135. Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K, Avruch J. (2005) Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr Biol*, 15: 702-713.
136. Dibble CC, Manning BD. (2013) Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output. *Nature cell biology*, 15: 555-564.
137. Dibble CC, Elis W, Menon S, Qin W, Klekota J, Asara JM, Finan PM, Kwiatkowski DJ, Murphy LO, Manning BD. (2012) TBC1D7 is a third subunit of the TSC1-TSC2 complex upstream of mTORC1. *Mol Cell*, 47: 535-546.
138. Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J. (2003) Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberlin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol*, 13: 1259-1268.
139. Menon S, Dibble CC, Talbott G, Hoxhaj G, Valvezan AJ, Takahashi H, Cantley LC, Manning BD. (2014) Spatial control of the TSC complex integrates insulin and nutrient regulation of mTORC1 at the lysosome. *Cell*, 156: 771-785.
140. Demetriades C, Doumpas N, Teleman AA. (2014) Regulation of TORC1 in response to amino acid starvation via lysosomal recruitment of TSC2. *Cell*, 156: 786-799.
141. Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. (2005) Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell*, 121: 179-193.
142. Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J. (2004) Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 13489-13494.
143. Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X, Yang Q, Bennett C, Harada Y, Stankunas K, Wang CY, He X, MacDougald OA, You M, Williams

- BO, Guan KL. (2006) TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell*, 126: 955-968.
144. Inoki K, Zhu T, Guan KL. (2003) TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, 115: 577-590.
145. Rogala KB, Gu X, Kedir JF, Abu-Remaileh M, Bianchi LF, Bottino AMS, Dueholm R, Niehaus A, Overwijn D, Fils AP, Zhou SX, Leary D, Laqtom NN, Brignole EJ, Sabatini DM. (2019) Structural basis for the docking of mTORC1 on the lysosomal surface. *Science*, 366: 468-475.
146. Shen K, Huang RK, Brignole EJ, Condon KJ, Valenstein ML, Chantranupong L, Bomaliyamu A, Choe A, Hong C, Yu Z, Sabatini DM. (2018) Architecture of the human GATOR1 and GATOR1-Rag GTPases complexes. *Nature*, 556: 64-69.
147. Gu X, Orozco JM, Saxton RA, Condon KJ, Liu GY, Krawczyk PA, Scaria SM, Harper JW, Gygi SP, Sabatini DM. (2017) SAMTOR is an S-adenosylmethionine sensor for the mTORC1 pathway. *Science*, 358: 813-818.
148. Jewell JL, Kim YC, Russell RC, Yu F-X, Park HW, Plouffe SW, Tagliabracci VS, Guan K-L. (2015) Metabolism. Differential regulation of mTORC1 by leucine and glutamine. *Science (New York, N.Y.)*, 347: 194-198.
149. DeYoung MP, Horak P, Sofer A, Sgroi D, Ellisen LW. (2008) Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev*, 22: 239-251.
150. 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: 3043-3053.
151. Xie J, Wang X, Proud CG. (2018) Who does TORC2 talk to? *Biochem J*, 475: 1721-1738.
152. Ebner M, Sinkovics B, Szczygiel M, Ribeiro DW, Yudushkin I. (2017) Localization of mTORC2 activity inside cells. *J Cell Biol*, 216: 343-353.
153. Senoo H, Kamimura Y, Kimura R, Nakajima A, Sawai S, Sesaki H, Iijima M. (2019) Phosphorylated Rho-GDP directly activates mTORC2 kinase towards AKT through dimerization with Ras-GTP to regulate cell migration. *Nat Cell Biol*, 21: 867-878.

154. Kovalski JR, Bhaduri A, Zehnder AM, Neela PH, Che Y, Wozniak GG, Khavari PA. (2019) The Functional Proximal Proteome of Oncogenic Ras Includes mTORC2. *Mol Cell*, 73: 830-844.e812.
155. Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, Fumagalli S, Allegrini PR, Kozma SC, Auwerx J, Thomas G. (2004) Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature*, 431: 200-205.
156. Kazyken D, Magnuson B, Bodur C, Acosta-Jaquez HA, Zhang D, Tong X, Barnes TM, Steinl GK, Patterson NE, Altheim CH, Sharma N, Inoki K, Cartee GD, Bridges D, Yin L, Riddle SM, Fingar DC. (2019) AMPK directly activates mTORC2 to promote cell survival during acute energetic stress. *Sci Signal*, 12.
157. Yeh CH, Bellon M, Nicot C. (2018) FBXW7: a critical tumor suppressor of human cancers. *Mol Cancer*, 17: 115.
158. Cai W, Song B, Ai H. (2019) Combined inhibition of FGFR and mTOR pathways is effective in suppressing ovarian cancer. *American journal of translational research*, 11: 1616-1625.
159. Downward J. (2003) Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 3: 11-22.
160. Gingras AC, Gygi SP, Raught B, Polakiewicz RD, Abraham RT, Hoekstra MF, Aebersold R, Sonenberg N. (1999) Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev*, 13: 1422-1437.
161. Hannan KM, Brandenburger Y, Jenkins A, Sharkey K, Cavanaugh A, Rothblum L, Moss T, Poortinga G, McArthur GA, Pearson RB, Hannan RD. (2003) mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Mol Cell Biol*, 23: 8862-8877.
162. Ma XM, Yoon SO, Richardson CJ, Julich K, Blenis J. (2008) SKAR links pre-mRNA splicing to mTOR/S6K1-mediated enhanced translation efficiency of spliced mRNAs. *Cell*, 133: 303-313.
163. Thoreen CC, Chantranupong L, Keys HR, Wang T, Gray NS, Sabatini DM. (2012) A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature*, 485: 109-113.

164. Gomez-Pinillos A, Ferrari AC. (2012) mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer therapy. *Hematol Oncol Clin North Am*, 26: 483-505, vii.
165. Peterson TR, Sengupta SS, Harris TE, Carmack AE, Kang SA, Balderas E, Guertin DA, Madden KL, Carpenter AE, Finck BN, Sabatini DM. (2011) mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell*, 146: 408-420.
166. Ben-Sahra I, Hoxhaj G, Ricoult SJH, Asara JM, Manning BD. (2016) mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. *Science*, 351: 728-733.
167. 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: 1323-1328.
168. Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK, Puigserver P. (2007) mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature*, 450: 736-740.
169. He L, Gomes AP, Wang X, Yoon SO, Lee G, Nagiec MJ, Cho S, Chavez A, Islam T, Yu Y, Asara JM, Kim BY, Blenis J. (2018) mTORC1 Promotes Metabolic Reprogramming by the Suppression of GSK3-Dependent Foxk1 Phosphorylation. *Mol Cell*, 70: 949-960.e944.
170. Zid BM, Rogers AN, Katewa SD, Vargas MA, Kolipinski MC, Lu TA, Benzer S, Kapahi P. (2009) 4E-BP extends lifespan upon dietary restriction by enhancing mitochondrial activity in *Drosophila*. *Cell*, 139: 149-160.
171. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan JL, Oshiro N, Mizushima N. (2009) Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell*, 20: 1981-1991.
172. Kim YM, Jung CH, Seo M, Kim EK, Park JM, Bae SS, Kim DH. (2015) mTORC1 phosphorylates UVRAG to negatively regulate autophagosome and endosome maturation. *Mol Cell*, 57: 207-218.
173. Odle RI, Walker SA, Oxley D, Kidger AM, Balmanno K, Gilley R, Okkenhaug H, Florey O, Ktistakis NT, Cook SJ. (2020) An mTORC1-to-CDK1 Switch

- Maintains Autophagy Suppression during Mitosis. *Molecular Cell*, 77: 228-240.e227.
174. Li X, Gao T. (2014) mTORC2 phosphorylates protein kinase C ζ to regulate its stability and activity. *EMBO reports*, 15: 191-198.
 175. Garcia-Martinez JM, Alessi DR. (2008) mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J*, 416: 375-385.
 176. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307: 1098-1101.
 177. Yang G, Murashige Danielle S, Humphrey Sean J, James David E. (2015) A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation. *Cell Reports*, 12: 937-943.
 178. Webb AE, Brunet A. (2014) FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control. *Trends Biochem Sci*, 39: 159-169.
 179. Hoxhaj G, Ben-Sahra I, Lockwood SE, Timson RC, Byles V, Henning GT, Gao P, Selfors LM, Asara JM, Manning BD. (2019) Direct stimulation of NADP(+) synthesis through Akt-mediated phosphorylation of NAD kinase. *Science*, 363: 1088-1092.
 180. Humphrey SJ, Yang G, Yang P, Fazakerley DJ, Stockli J, Yang JY, James DE. (2013) Dynamic adipocyte phosphoproteome reveals that Akt directly regulates mTORC2. *Cell Metab*, 17: 1009-1020.
 181. Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)*, 28: 721-726.
 182. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, Tykodi SS, Sosman JA, Procopio G, Plimack ER, Castellano D, Choueiri TK, Gurney H, Donskov F, Bono P, Wagstaff J, Gaurer TC, Ueda T, Tomita Y, Schutz FA, Kollmannsberger C, Larkin J, Ravaud A, Simon JS, Xu L-A, Waxman IM, Sharma P. (2015) Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 373: 1803-1813.
 183. Baselga J, Campone M, Piccart M, Burris HA, Rugo HS, Sahmoud T, Noguchi S, Gnani M, Pritchard KI, Lebrun F, Beck JT, Ito Y, Yardley D, Deleu I, Perez A,

- Bachelot T, Vittori L, Xu Z, Mukhopadhyay P, Lebwohl D, Hortobagyi GN. (2011) Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 366: 520-529.
184. Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, Van Cutsem E, Hobday TJ, Okusaka T, Capdevila J, de Vries EG, Tomassetti P, Pavel ME, Hoosen S, Haas T, Lincy J, Lebwohl D, Oberg K. (2011) Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med*, 364: 514-523.
185. Demetri GD, Chawla SP, Ray-Coquard I, Le Cesne A, Staddon AP, Milhem MM, Penel N, Riedel RF, Bui-Nguyen B, Cranmer LD, Reichardt P, Bompas E, Alcindor T, Rushing D, Song Y, Lee RM, Ebbinghaus S, Eid JE, Loewy JW, Haluska FG, Dodion PF, Blay JY. (2013) Results of an international randomized phase III trial of the mammalian target of rapamycin inhibitor ridaforolimus versus placebo to control metastatic sarcomas in patients after benefit from prior chemotherapy. *J Clin Oncol*, 31: 2485-2492.
186. Kim LC, Cook RS, Chen J. (2017) mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment. *Oncogene*, 36: 2191-2201.
187. Banerji U, Dean EJ, Gonzalez M, Greystoke AP, Basu B, Krebs M, Puglisi M, Grinsted L, Oelmann E, Burke W, Harrington E, Green S, Ranson M. (2012) First-in-human phase I trial of the dual mTORC1 and mTORC2 inhibitor AZD2014 in solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 30: 3004-3004.
188. 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: 272-276.
189. Lin J, Sampath D, Nannini MA, Lee BB, Degtyarev M, Oeh J, Savage H, Guan Z, Hong R, Kassees R, Lee LB, Risom T, Gross S, Liederer BM, Koeppen H, Skelton NJ, Wallin JJ, Belvin M, Punnoose E, Friedman LS, Lin K. (2013) Targeting Activated Akt with GDC-0068, a Novel Selective Akt Inhibitor That Is Efficacious in Multiple Tumor Models. *Clinical Cancer Research*, 19: 1760.
190. Seiler M, Ray-Coquard I, Melichar B, Yardley DA, Wang RX, Dodion PF, Lee MA. (2015) Oral Ridaforolimus Plus Trastuzumab for Patients With

- HER2⁺ Trastuzumab-Refractory Metastatic Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*, 15: 60-65.
191. Kornblum N, Zhao F, Manola J, Klein P, Ramaswamy B, Brufsky A, Stella PJ, Burnette B, Telli M, Makower DF, Cheema P, Truica CI, Wolff AC, Soori GS, Haley B, Wassenaar TR, Goldstein LJ, Miller KD, Sparano JA. (2018) Randomized Phase II Trial of Fulvestrant Plus Everolimus or Placebo in Postmenopausal Women With Hormone Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Metastatic Breast Cancer Resistant to Aromatase Inhibitor Therapy: Results of PrE0102. *J Clin Oncol*, 36: 1556-1563.
 192. Kyriakopoulos CE, Braden AM, Kolesar JM, Eickhoff JC, Bailey HH, Heideman J, Liu G, Wisinski KB. (2017) A phase I study of tivantinib in combination with temsirolimus in patients with advanced solid tumors. *Investigational New Drugs*, 35: 290-297.
 193. Hollebecque A, Bahleda R, Faivre L, Adam J, Poinsignon V, Paci A, Gomez-Roca C, Thery JC, Le Deley MC, Varga A, Gazzah A, Ileana E, Gharib M, Angevin E, Malekzadeh K, Massard C, Soria JC, Spano JP. (2017) Phase I study of temsirolimus in combination with cetuximab in patients with advanced solid tumours. *European Journal of Cancer*, 81: 81-89.
 194. Singh JC, Novik Y, Stein S, Volm M, Meyers M, Smith J, Omene C, Speyer J, Schneider R, Jhaveri K, Formenti S, Kyriakou V, Joseph B, Goldberg JD, Li X, Adams S, Tiersten A. (2014) Phase 2 trial of everolimus and carboplatin combination in patients with triple negative metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research*, 16: R32.
 195. Decker T, Marschner N, Muendlein A, Welt A, Hagen V, Rauh J, Schröder H, Jaehnig P, Potthoff K, Lerchenmüller C. (2019) VicTORia: a randomised phase II study to compare vinorelbine in combination with the mTOR inhibitor everolimus versus vinorelbine monotherapy for second-line chemotherapy in advanced HER2-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 176: 637-647.
 196. Jovanovic B, Mayer IA, Mayer EL, Abramson VG, Bardia A, Sanders ME, Kuba MG, Estrada MV, Beeler JS, Shaver TM, Johnson KC, Sanchez V, Rosenbluth JM, Dillon PM, Forero-Torres A, Chang JC, Meszoely IM, Grau AM, Lehmann

- BD, Shyr Y, Sheng Q, Chen SC, Arteaga CL, Pietenpol JA. (2017) A Randomized Phase II Neoadjuvant Study of Cisplatin, Paclitaxel With or Without Everolimus in Patients with Stage II/III Triple-Negative Breast Cancer (TNBC): Responses and Long-term Outcome Correlated with Increased Frequency of DNA Damage Response Gene Mutations, TNBC Subtype, AR Status, and Ki67. *Clin Cancer Res*, 23: 4035-4045.
197. Park IH, Kong S-Y, Kwon Y, Kim MK, Sim SH, Joo J, Lee KS. (2018) Phase I/II clinical trial of everolimus combined with gemcitabine/cisplatin for metastatic triple-negative breast cancer. *Journal of Cancer*, 9: 1145-1151.
198. Trucco MM, Meyer CF, Thornton KA, Shah P, Chen AR, Wilky BA, Carrera-Haro MA, Boyer LC, Ferreira MF, Shafique U, Powell JD, Loeb DM. (2018) A phase II study of temsirolimus and liposomal doxorubicin for patients with recurrent and refractory bone and soft tissue sarcomas. *Clin Sarcoma Res*, 8: 21.
199. Place AE, Pikman Y, Stevenson KE, Harris MH, Pauly M, Sulis ML, Hijiya N, Gore L, Cooper TM, Loh ML, Roti G, Neuberg DS, Hunt SK, Orloff-Parry S, Stegmaier K, Sallan SE, Silverman LB. (2018) Phase I trial of the mTOR inhibitor everolimus in combination with multi-agent chemotherapy in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*, 65: e27062.
200. Vidal GA, Chen M, Sheth S, Svahn T, Guardino E. (2017) Phase I Trial of Everolimus and Capecitabine in Metastatic HER2(-) Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*, 17: 418-426.
201. Toda K, Kawada K, Iwamoto M, Inamoto S, Sasazuki T, Shirasawa S, Hasegawa S, Sakai Y. (2016) Metabolic Alterations Caused by KRAS Mutations in Colorectal Cancer Contribute to Cell Adaptation to Glutamine Depletion by Upregulation of Asparagine Synthetase. *Neoplasia*, 18: 654-665.
202. Yang CS, Matsuura K, Huang NJ, Robeson AC, Huang B, Zhang L, Kornbluth S. (2015) Fatty acid synthase inhibition engages a novel caspase-2 regulatory mechanism to induce ovarian cancer cell death. *Oncogene*, 34: 3264-3272.
203. Khawaja MR, Nick AM, Madhusudanannair V, Fu S, Hong D, McQuinn LM, Ng CS, Piha-Paul SA, Janku F, Subbiah V, Tsimberidou A, Karp D, Meric-Bernstam F, Lu KH, Naing A. (2016) Phase I dose escalation study of temsirolimus in

- combination with metformin in patients with advanced/refractory cancers. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 77: 973-977.
204. Haas NB, Appleman LJ, Stein M, Redlinger M, Wilks M, Xu X, Onorati A, Kalavacharla A, Kim T, Zhen CJ, Kadri S, Segal JP, Gimotty PA, Davis LE, Amaravadi RK. (2019) Autophagy Inhibition to Augment mTOR Inhibition: a Phase I/II Trial of Everolimus and Hydroxychloroquine in Patients with Previously Treated Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*, 25: 2080-2087.
 205. 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: 803-820.
 206. Turkalp Z, Karamchandani J, Das S. (2014) IDH mutation in glioma: new insights and promises for the future. *JAMA Neurol*, 71: 1319-1325.
 207. Waitkus MS, Diplas BH, Yan H. (2016) Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas. *Neuro Oncol*, 18: 16-26.
 208. Cloughesy TF, Cavenee WK, Mischel PS. (2014) Glioblastoma: from molecular pathology to targeted treatment. *Annu Rev Pathol*, 9: 1-25.
 209. 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: 183-192.
 210. Menon S, Manning BD. (2008) Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors. *Oncogene*, 27 Suppl 2: S43-S51.
 211. Vadla R, Haldar D. (2018) Mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) controls glycolytic gene expression by regulating Histone H3 Lysine 56 acetylation. *Cell Cycle*, 17: 110-123.
 212. Morita M, Gravel SP, Chenard V, Sikstrom K, Zheng L, Alain T, Gandin V, Avizonis D, Arguello M, Zakaria C, McLaughlan S, Nouet Y, Pause A, Pollak M, Gottlieb E, Larsson O, St-Pierre J, Topisirovic I, Sonenberg N. (2013) mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation. *Cell Metab*, 18: 698-711.

213. Batsios G, Viswanath P, Subramani E, Najac C, Gillespie AM, Santos RD, Molloy AR, Pieper RO, Ronen SM. (2019) PI3K/mTOR inhibition of IDH1 mutant glioma leads to reduced 2HG production that is associated with increased survival. *Scientific Reports*, 9: 10521.
214. Benavides-Serrato A, Lee J, Holmes B, Landon KA, Bashir T, Jung ME, Lichtenstein A, Gera J. (2017) Specific blockade of Rictor-mTOR association inhibits mTORC2 activity and is cytotoxic in glioblastoma. *PLOS ONE*, 12: e0176599.
215. Sanzey M, Abdul Rahim SA, Oudin A, Dirkse A, Kaoma T, Vallar L, Herold-Mende C, Bjerkgvig R, Golebiewska A, Niclou SP. (2015) Comprehensive analysis of glycolytic enzymes as therapeutic targets in the treatment of glioblastoma. *PLoS One*, 10: e0123544.
216. Prasanna VK, Venkataramana NK, Dwarakanath BS, Santhosh V. (2009) Differential responses of tumors and normal brain to the combined treatment of 2-DG and radiation in glioblastoma. *J Cancer Res Ther*, 5 Suppl 1: S44-47.
217. Colen CB, Shen Y, Ghoddoussi F, Yu P, Francis TB, Koch BJ, Monterey MD, Galloway MP, Sloan AE, Mathupala SP. (2011) Metabolic targeting of lactate efflux by malignant glioma inhibits invasiveness and induces necrosis: an in vivo study. *Neoplasia*, 13: 620-632.
218. Jezek P. (2020) 2-Hydroxyglutarate in Cancer Cells. *Antioxid Redox Signal*.
219. Tanaka K, Sasayama T, Irino Y, Takata K, Nagashima H, Satoh N, Kyotani K, Mizowaki T, Imahori T, Ejima Y. (2015) Compensatory glutamine metabolism promotes glioblastoma resistance to mTOR inhibitor treatment. *The Journal of clinical investigation*, 125: 1591-1602.
220. Guo D, Bell EH, Chakravarti A. (2013) Lipid metabolism emerges as a promising target for malignant glioma therapy. *CNS Oncol*, 2: 289-299.
221. Cirillo A, Di Salle A, Petillo O, Melone MA, Grimaldi G, Bellotti A, Torelli G, De' Santi MS, Cantatore G, Marinelli A, Galderisi U, Peluso G. (2014) High grade glioblastoma is associated with aberrant expression of ZFP57, a protein involved in gene imprinting, and of CPT1A and CPT1C that regulate fatty acid metabolism. *Cancer Biol Ther*, 15: 735-741.

222. 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: 1603-1614.
223. Yang K, Niu L, Bai Y, Le W. (2019) Glioblastoma: Targeting the autophagy in tumorigenesis. *Brain Res Bull*, 153: 334-340.
224. Nkondjock A, Ghadirian P. (2005) Risk factors and risk reduction of breast cancer. *Medecine sciences: M/S*, 21: 175-180.
225. Horváth Z, Boér K, Dank M, Kahán Z, Kocsis J, Kövér E, Pajkos G, Pikó B, Rubovszky G, Eckhardt S. (2016) Az emlőrák szisztémás kezelése: szakmai útmutatás. *Magyar Onkológia*, 60: 241-257.
226. Sonnenblick A, Fumagalli D, Sotiriou C, Piccart M. (2014) Is the differentiation into molecular subtypes of breast cancer important for staging, local and systemic therapy, and follow up? *Cancer Treat Rev*, 40: 1089-1095.
227. Gonzalez-Angulo AM, Timms KM, Liu S, Chen H, Litton JK, Potter J, Lanchbury JS, Stemke-Hale K, Hennessy BT, Arun BK, Hortobagyi GN, Do K-A, Mills GB, Meric-Bernstam F. (2011) Incidence and Outcome of BRCA Mutations in Unselected Patients with Triple Receptor-Negative Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 17: 1082.
228. Rich TA, Woodson AH, Litton J, Arun B. (2015) Hereditary breast cancer syndromes and genetic testing. *J Surg Oncol*, 111: 66-80.
229. Elston CW, Ellis IO. (2002) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. CW Elston & IO Ellis. *Histopathology* 1991; 19: 403–410: AUTHOR COMMENTARY. *Histopathology*, 41: 151-151.
230. Lázár G, Besznyák I, Boross G, Farsang Z, Gulyás G, Jakab F, Maráz R, Márkus B, Tóth L. (2010) Az emlőrák korszerű sebészi kezelése. *Magyar Onkológia*, 54: 227-234.
231. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio I, Zackrisson S, Senkus E. (2019) Early breast cancer: ESMO Clinical Practice

- Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 30: 1194-1220.
232. Burstein HJ, Curigliano G, Loibl S, Dubsy P, Gnant M, Poortmans P, Colleoni M, Denkert C, Piccart-Gebhart M, Regan M, Senn HJ, Winer EP, Thurlimann B, Members of the St. Gallen International Consensus Panel on the Primary Therapy of Early Breast C. (2019) Estimating the benefits of therapy for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for the primary therapy of early breast cancer 2019. *Annals of Oncology*, 30: 1541-1557.
233. Adams S, Gatti-Mays ME, Kalinsky K, Korde LA, Sharon E, Amiri-Kordestani L, Bear H, McArthur HL, Frank E, Perlmutter J, Page DB, Vincent B, Hayes JF, Gulley JL, Litton JK, Hortobagyi GN, Chia S, Krop I, White J, Sparano J, Disis ML, Mittendorf EA. (2019) Current Landscape of Immunotherapy in Breast Cancer: A Review. *JAMA Oncol*.
234. Fredholm H, Magnusson K, Lindström LS, Garmo H, Fält SE, Lindman H, Bergh J, Holmberg L, Pontén F, Frisell J, Fredriksson I. (2016) Long-term outcome in young women with breast cancer: a population-based study. *Breast Cancer Research and Treatment*, 160: 131-143.
235. Howlader N, Altekruse SF, Li CI, Chen VW, Clarke CA, Ries LA, Cronin KA. (2014) US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 106.
236. 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: 3984-4001.
237. Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Trimmer C, Flomenberg N, Wang C, Pavlides S, Pestell RG, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP. (2011) Cancer cells metabolically "fertilize" the tumor microenvironment with hydrogen peroxide, driving the Warburg effect. *Cell Cycle*, 10: 2504-2520.
238. Budezies J, Brockmüller SF, Müller BM, Barupal DK, Richter-Ehrenstein C, Kleine-Tebbe A, Griffin JL, Orešič M, Dietel M, Denkert C, Fiehn O. (2013) Comparative metabolomics of estrogen receptor positive and estrogen receptor

- negative breast cancer: alterations in glutamine and beta-alanine metabolism. *Journal of Proteomics*, 94: 279-288.
239. 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 MLM, 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. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13: 890.
240. O'Mahony F, Razandi M, Pedram A, Harvey BJ, Levin ER. (2012) Estrogen Modulates Metabolic Pathway Adaptation to Available Glucose in Breast Cancer Cells. *Molecular Endocrinology*, 26: 2058-2070.
241. Krętowski R, Borzym-Kluczyk M, Stypułkowska A, Brańska-Januszewska J, Ostrowska H, Cechowska-Pasko M. (2016) Low glucose dependent decrease of apoptosis and induction of autophagy in breast cancer MCF-7 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 417: 35-47.
242. Poirot M, Silvente-Poirot S, Weichselbaum RR. (2012) Cholesterol metabolism and resistance to tamoxifen. *Current Opinion in Pharmacology*, 12: 683-689.
243. Pitroda SP, Khodarev NN, Beckett MA, Kufe DW, Weichselbaum RR. (2009) MUC1-induced alterations in a lipid metabolic gene network predict response of human breast cancers to tamoxifen treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106: 5837.
244. Shah KN, Mehta KR, Peterson D, Evangelista M, Livesey JC, Faridi JS. (2014) AKT-Induced Tamoxifen Resistance Is Overturned by RRM2 Inhibition. *Molecular Cancer Research*, 12: 394.
245. Doyen J, Trastour C, Ettore F, Peyrottes I, Toussant N, Gal J, Ilc K, Roux D, Parks SK, Ferrero JM, Pouysségur J. (2014) Expression of the hypoxia-inducible monocarboxylate transporter MCT4 is increased in triple negative breast cancer and correlates independently with clinical outcome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 451: 54-61.
246. Elia I, Schmieder R, Christen S, Fendt SM. (2016) Organ-Specific Cancer Metabolism and Its Potential for Therapy. *Handb Exp Pharmacol*, 233: 321-353.
247. Youngblood VM, Kim LC, Edwards DN, Hwang Y, Santapuram PR, Stirdivant SM, Lu P, Ye F, Brantley-Sieders DM, Chen J. (2016) The Ephrin-A1/EPHA2

- Signaling Axis Regulates Glutamine Metabolism in HER2-Positive Breast Cancer. *Cancer Research*, 76: 1825.
248. Camarda R, Zhou AY, Kohnz RA, Balakrishnan S, Mahieu C, Anderton B, Eyob H, Kajimura S, Tward A, Krings G, Nomura DK, Goga A. (2016) Inhibition of fatty acid oxidation as a therapy for MYC-overexpressing triple-negative breast cancer. *Nature Medicine*, 22: 427-432.
249. Giro-Perafita A, Sarrats A, Perez-Bueno F, Oliveras G, Buxo M, Brunet J, Vinas G, Miquel TP. (2017) Fatty acid synthase expression and its association with clinico-histopathological features in triple-negative breast cancer. *Oncotarget*, 8: 74391-74405.
250. Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang X-Y, Pfeiffer HK, Nissim I, Daikhin E, Yudkoff M, McMahon SB, Thompson CB. (2008) Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 18782.
251. Haukaas TH, Euceda LR, Giskeødegård GF, Lamichhane S, Krohn M, Jernström S, Aure MR, Lingjærde OC, Schlichting E, Garred Ø. (2016) Metabolic clusters of breast cancer in relation to gene-and protein expression subtypes. *Cancer & metabolism*, 4: 12.
252. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer Jr CE, Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle JN, Wolmark N. (2005) Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 353: 1673-1684.
253. Wang Y, Shu Y, Gu C, Fan Y. (2019) The novel sugar transporter SLC50A1 as a potential serum-based diagnostic and prognostic biomarker for breast cancer. *Cancer management and research*, 11: 865-876.
254. Zhang S, Pei M, Li Z, Li H, Liu Y, Li J. (2018) Double-negative feedback interaction between DNA methyltransferase 3A and microRNA-145 in the Warburg effect of ovarian cancer cells. *Cancer Sci*, 109: 2734-2745.

255. Yao A, Xiang Y, Si YR, Fan LJ, Li JP, Li H, Guo W, He HX, Liang XJ, Tan Y, Bao LY, Liao XH. (2019) PKM2 promotes glucose metabolism through a let-7a-5p/Stat3/hnRNP-A1 regulatory feedback loop in breast cancer cells. *J Cell Biochem*, 120: 6542-6554.
256. Samanta D, Park Y, Andrabi SA, Shelton LM, Gilkes DM, Semenza GL. (2016) PHGDH Expression Is Required for Mitochondrial Redox Homeostasis, Breast Cancer Stem Cell Maintenance, and Lung Metastasis. *Cancer Research*, 76: 4430.
257. Zhang J-S, Lei J-P, Wei G-Q, Chen H, Ma C-Y, Jiang H-Z. (2016) Natural fatty acid synthase inhibitors as potent therapeutic agents for cancers: A review. *Pharmaceutical Biology*, 54: 1919-1925.
258. Han S, Wei R, Zhang X, Jiang N, Fan M, Huang JH, Xie B, Zhang L, Miao W, Butler AC, Coleman MA, Vaughan AT, Wang Y, Chen HW, Liu J, Li JJ. (2019) CPT1A/2-Mediated FAO Enhancement-A Metabolic Target in Radioresistant Breast Cancer. *Front Oncol*, 9: 1201.
259. Sica V, Bravo-San Pedro JM, Stoll G, Kroemer G. (2020) Oxidative phosphorylation as a potential therapeutic target for cancer therapy. *Int J Cancer*, 146: 10-17.
260. Sacco F, Calderone A, Castagnoli L, Cesareni G. (2016) The cell-autonomous mechanisms underlying the activity of metformin as an anticancer drug. *British Journal of Cancer*, 115: 1451-1456.
261. Foucquier J, Guedj M. (2015) Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacology research & perspectives*, 3: e00149.
262. Harbeck N, Thomssen C, Gnant M. (2013) St. Gallen 2013: brief preliminary summary of the consensus discussion. *Breast care (Basel, Switzerland)*, 8: 102-109.
263. Krencz I, Sebestyen A, Papay 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.
264. Szoboszlai N, Guo X, Ozohanics O, Olah J, Gomory A, Mihucz VG, Jeney A, Vekey 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: 108-115.
265. Mihaly Z, Kormos M, Lanczky A, Dank M, Budczies J, Szasz MA, Gyorffy B. (2013) A meta-analysis of gene expression-based biomarkers predicting outcome after tamoxifen treatment in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 140: 219-232.
266. Campbell SL, Wellen KE. (2018) Metabolic Signaling to the Nucleus in Cancer. *Mol Cell*, 71: 398-408.
267. Jia D, Lu M, Jung KH, Park JH, Yu L, Onuchic JN, Kaiparettu BA, Levine H. (2019) Elucidating cancer metabolic plasticity by coupling gene regulation with metabolic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116: 3909-3918.
268. Touat M, Idbaih A, Sanson M, Ligon KL. (2017) Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights. *Ann Oncol*, 28: 1457-1472.
269. Masui K, Onizuka H, Cavenee WK, Mischel PS, Shibata N. (2019) Metabolic reprogramming in the pathogenesis of glioma: Update. *Neuropathology*, 39: 3-13.
270. Parada LF, Dirks PB, Wechsler-Reya RJ. (2017) Brain Tumor Stem Cells Remain in Play. *J Clin Oncol*, 35: 2428-2431.
271. Faes S, Santoro T, Demartines N, Dormond O. (2017) Evolving Significance and Future Relevance of Anti-Angiogenic Activity of mTOR Inhibitors in Cancer Therapy. *Cancers (Basel)*, 9.
272. Ramirez YP, Weatherbee JL, Wheelhouse RT, Ross AH. (2013) Glioblastoma multiforme therapy and mechanisms of resistance. *Pharmaceuticals (Basel)*, 6: 1475-1506.
273. Hujber Z, Horvath G, Petovari G, Krencz I, Danko T, Meszaros K, Rajnai H, Szoboszlai N, Leenders WPJ, Jeney A, Tretter L, Sebestyeny A. (2018) GABA, glutamine, glutamate oxidation and succinic semialdehyde dehydrogenase expression in human gliomas. *J Exp Clin Cancer Res*, 37: 271.
274. Wakamiya T, Suzuki SO, Hamasaki H, Honda H, Mizoguchi M, Yoshimoto K, Iwaki T. (2014) Elevated expression of fatty acid synthase and nuclear localization of carnitine palmitoyltransferase 1C are common among human gliomas. *Neuropathology*, 34: 465-474.

275. Liu B, Huang ZB, Chen X, See YX, Chen ZK, Yao HK. (2019) Mammalian Target of Rapamycin 2 (MTOR2) and C-MYC Modulate Glucosamine-6-Phosphate Synthesis in Glioblastoma (GBM) Cells Through Glutamine: Fructose-6-Phosphate Aminotransferase 1 (GFAT1). *Cell Mol Neurobiol*, 39: 415-434.
276. Petovari G, Danko T, Krencz I, Hujber Z, Rajnai H, Vetlenyi E, Raffay R, Papay J, Jeney A, Sebestyen A. (2019) Inhibition of Metabolic Shift can Decrease Therapy Resistance in Human High-Grade Glioma Cells. *Pathol Oncol Res*.
277. Lu CL, Qin L, Liu HC, Candas D, Fan M, Li JJ. (2015) Tumor cells switch to mitochondrial oxidative phosphorylation under radiation via mTOR-mediated hexokinase II inhibition--a Warburg-reversing effect. *PLoS One*, 10: e0121046.
278. Oliva CR, Nozell SE, Diers A, McClugage SG, 3rd, Sarkaria JN, Markert JM, Darley-Usmar VM, Bailey SM, Gillespie GY, Landar A, Griguer CE. (2010) Acquisition of temozolomide chemoresistance in gliomas leads to remodeling of mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem*, 285: 39759-39767.
279. Oliva CR, Markert T, Ross LJ, White EL, Rasmussen L, Zhang W, Everts M, Moellering DR, Bailey SM, Suto MJ, Griguer CE. (2016) Identification of Small Molecule Inhibitors of Human Cytochrome c Oxidase That Target Chemoresistant Glioma Cells. *J Biol Chem*, 291: 24188-24199.
280. Schug ZT, Peck B, Jones DT, Zhang Q, Grosskurth S, Alam IS, Goodwin LM, Smethurst E, Mason S, Blyth K, McGarry L, James D, Shanks E, Kalna G, Saunders RE, Jiang M, Howell M, Lassailly F, Thin MZ, Spencer-Dene B, Stamp G, van den Broek NJ, Mackay G, Bulusu V, Kamphorst JJ, Tardito S, Strachan D, Harris AL, Aboagye EO, Critchlow SE, Wakelam MJ, Schulze A, Gottlieb E. (2015) Acetyl-CoA synthetase 2 promotes acetate utilization and maintains cancer cell growth under metabolic stress. *Cancer Cell*, 27: 57-71.
281. Li X, Yu W, Qian X, Xia Y, Zheng Y, Lee JH, Li W, Lyu J, Rao G, Zhang X, Qian CN, Rozen SG, Jiang T, Lu Z. (2017) Nucleus-Translocated ACSS2 Promotes Gene Transcription for Lysosomal Biogenesis and Autophagy. *Mol Cell*, 66: 684-697.e689.
282. Lin H, Patel S, Affleck VS, Wilson I, Turnbull DM, Joshi AR, Maxwell R, Stoll EA. (2017) Fatty acid oxidation is required for the respiration and proliferation of malignant glioma cells. *Neuro Oncol*, 19: 43-54.

283. Basho RK, Gilcrease M, Murthy RK, Helgason T, Karp DD, Meric-Bernstam F, Hess KR, Herbrich SM, Valero V, Albarracin C, Litton JK, Chavez-MacGregor M, Ibrahim NK, Murray JL, 3rd, Koenig KB, Hong D, Subbiah V, Kurzrock R, Janku F, Moulder SL. (2017) Targeting the PI3K/AKT/mTOR Pathway for the Treatment of Mesenchymal Triple-Negative Breast Cancer: Evidence From a Phase 1 Trial of mTOR Inhibition in Combination With Liposomal Doxorubicin and Bevacizumab. *JAMA Oncol*, 3: 509-515.
284. Stepanenko AA, Andreieva SV, Korets KV, Mykytenko DO, Baklaushev VP, Huleyuk NL, Kovalova OA, Kotsarenko KV, Chekhonin VP, Vassetzky YS, Avdieiev SS, Dmitrenko VV. (2016) Temozolomide promotes genomic and phenotypic changes in glioblastoma cells. *Cancer Cell Int*, 16: 36.
285. Agnihotri S, Zadeh G. (2016) Metabolic reprogramming in glioblastoma: the influence of cancer metabolism on epigenetics and unanswered questions. *Neuro Oncol*, 18: 160-172.
286. Hsu SPC, Kuo JS, Chiang HC, Wang HE, Wang YS, Huang CC, Huang YC, Chi MS, Mehta MP, Chi KH. (2018) Temozolomide, sirolimus and chloroquine is a new therapeutic combination that synergizes to disrupt lysosomal function and cholesterol homeostasis in GBM cells. *Oncotarget*, 9: 6883-6896.
287. Yan Y, Xu Z, Dai S, Qian L, Sun L, Gong Z. (2016) Targeting autophagy to sensitive glioma to temozolomide treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35: 23.
288. Wang X, Qiu Y, Yu Q, Li H, Chen X, Li M, Long Y, Liu Y, Lu L, Tang J, Zhang Z, He Q. (2018) Enhanced glioma therapy by synergistic inhibition of autophagy and tyrosine kinase activity. *Int J Pharm*, 536: 1-10.
289. Cj P, Hv E, Vijayakurup V, G RM, Nair S, Gopala S. (2019) High LC3/Beclin Expression Correlates with Poor Survival in Glioma: a Definitive Role for Autophagy as Evidenced by In Vitro Autophagic Flux. *Pathol Oncol Res*, 25: 137-148.
290. Henson E, Chen Y, Gibson S. (2017) EGFR Family Members' Regulation of Autophagy Is at a Crossroads of Cell Survival and Death in Cancer. *Cancers (Basel)*, 9.

291. Wang-Gillam A, Siegel E, Mayes DA, Hutchins LF, Zhou Y-H. (2007) Anti-tumor effect of doxycycline on glioblastoma cells. *Journal of Cancer Molecules*, 3: 147.
292. Ng HY, Oliver BG, Burgess JK, Krymskaya VP, Black JL, Moir LM. (2015) Doxycycline reduces the migration of tuberous sclerosis complex-2 null cells - effects on RhoA-GTPase and focal adhesion kinase. *J Cell Mol Med*, 19: 2633-2646.
293. De Francesco EM, Bonuccelli G, Maggiolini M, Sotgia F, Lisanti MP. (2017) Vitamin C and Doxycycline: A synthetic lethal combination therapy targeting metabolic flexibility in cancer stem cells (CSCs). *Oncotarget*, 8: 67269-67286.
294. Tan Q, Yan X, Song L, Yi H, Li P, Sun G, Yu D, Li L, Zeng Z, Guo Z. (2017) Induction of Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Damage by Antibiotic Drug Doxycycline Enhances the Responsiveness of Glioblastoma to Chemotherapy. *Med Sci Monit*, 23: 4117-4125.
295. Scalise M, Pochini L, Galluccio M, Console L, Indiveri C. (2017) Glutamine Transport and Mitochondrial Metabolism in Cancer Cell Growth. *Front Oncol*, 7: 306.
296. Sesen J, Dahan P, Scotland SJ, Saland E, Dang VT, Lemarie A, Tyler BM, Brem H, Toulas C, Cohen-Jonathan Moyal E, Sarry JE, Skuli N. (2015) Metformin inhibits growth of human glioblastoma cells and enhances therapeutic response. *PLoS One*, 10: e0123721.
297. Jiang W, Finniss S, Cazacu S, Xiang C, Brodie Z, Mikkelsen T, Poisson L, Shackelford DB, Brodie C. (2016) Repurposing phenformin for the targeting of glioma stem cells and the treatment of glioblastoma. *Oncotarget*, 7: 56456-56470.
298. Dotevall L, Hagberg L. (1989) Penetration of doxycycline into cerebrospinal fluid in patients treated for suspected Lyme neuroborreliosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 33: 1078-1080.
299. Piva R, Ticconi F, Ceriani V, Scalorbi F, Fiz F, Capitanio S, Bauckneht M, Cittadini G, Sambuceti G, Morbelli S. (2017) Comparative diagnostic accuracy of 18F-FDG PET/CT for breast cancer recurrence. *Breast cancer (Dove Medical Press)*, 9: 461-471.

300. Lin J, Xia L, Liang J, Han Y, Wang H, Oyang L, Tan S, Tian Y, Rao S, Chen X, Tang Y, Su M, Luo X, Wang Y, Wang H, Zhou Y, Liao Q. (2019) The roles of glucose metabolic reprogramming in chemo- and radio-resistance. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38: 218.
301. Yu M, Chen S, Hong W, Gu Y, Huang B, Lin Y, Zhou Y, Jin H, Deng Y, Tu L, Hou B, Jian Z. (2019) Prognostic role of glycolysis for cancer outcome: evidence from 86 studies. *J Cancer Res Clin Oncol*, 145: 967-999.
302. Reckzeh ES, Waldmann H. (2020) Small-Molecule Inhibition of Glucose Transporters GLUT-1-4. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 21: 45-52.
303. Hatem R, El Botty R, Chateau-Joubert S, Servely JL, Labiod D, de Plater L, Assayag F, Coussy F, Callens C, Vacher S, Reyat F, Cosulich S, Dieras V, Bieche I, Marangoni E. (2016) Targeting mTOR pathway inhibits tumor growth in different molecular subtypes of triple-negative breast cancers. *Oncotarget*, 7: 48206-48219.
304. Bostner J, Karlsson E, Pandiyan MJ, Westman H, Skoog L, Fornander T, Nordenskjold B, Stal O. (2013) Activation of Akt, mTOR, and the estrogen receptor as a signature to predict tamoxifen treatment benefit. *Breast Cancer Res Treat*, 137: 397-406.
305. Perez-Tenorio G, Karlsson E, Waltersson MA, Olsson B, Holmlund B, Nordenskjold B, Fornander T, Skoog L, Stal O. (2011) Clinical potential of the mTOR targets S6K1 and S6K2 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 128: 713-723.
306. Sonnenblick A, Venet D, Brohée S, Pondé N, Sotiriou C. (2019) pAKT pathway activation is associated with PIK3CA mutations and good prognosis in luminal breast cancer in contrast to p-mTOR pathway activation. *NPJ breast cancer*, 5: 7-7.
307. Sobhani N, Generali D, Zanconati F, Bortul M, Scaggiante B. (2018) Current status of PI3K-mTOR inhibition in hormone-receptor positive, HER2-negative breast cancer. *World journal of clinical oncology*, 9: 172-179.

308. Costa RLB, Han HS, Gradishar WJ. (2018) Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in triple-negative breast cancer: a review. *Breast Cancer Res Treat*, 169: 397-406.
309. Yardley DA, Liggett W, Mainwaring M, Castellon A, Blakely L, Hemphill B, Anz III B, Young RR, Shastry M, DeBusk L. (2019) A Phase II Open Label Study of Everolimus in Combination with Endocrine Therapy in Resistant Hormone Receptor-Positive HER2-Negative Advanced Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*.
310. Veiga SR, Ge X, Mercer CA, Hernandez-Alvarez MI, Thomas HE, Hernandez-Losa J, Ramon YCS, Zorzano A, Thomas G, Kozma SC. (2018) Phenformin-Induced Mitochondrial Dysfunction Sensitizes Hepatocellular Carcinoma for Dual Inhibition of mTOR. *Clin Cancer Res*, 24: 3767-3780.
311. Petővári G, Dankó T, Krencz I, Hujber Z, Rajnai H, Vetlényi E, Raffay R, Pápay J, Jeney A, Sebestyén A. (2019) Inhibition of Metabolic Shift can Decrease Therapy Resistance in Human High-Grade Glioma Cells. *Pathology & Oncology Research*.
312. Chiche J, Reverso-Meinietti J, Mouchotte A, Rubio-Patino C, Mhaidly R, Villa E, Bossowski JP, Proics E, Grima-Reyes M, Paquet A, Fragaki K, Marchetti S, Briere J, Ambrosetti D, Michiels JF, Molina TJ, Copie-Bergman C, Lehmann-Che J, Peyrottes I, Peyrade F, de Kerviler E, Taillan B, Garnier G, Verhoeyen E, Paquis-Flucklinger V, Shintu L, Delwail V, Delpéch-Debiais C, Delarue R, Bosly A, Petrella T, Brisou G, Nadel B, Barbry P, Mounier N, Thieblemont C, Ricci JE. (2019) GAPDH Expression Predicts the Response to R-CHOP, the Tumor Metabolic Status, and the Response of DLBCL Patients to Metabolic Inhibitors. *Cell Metab*, 29: 1243-1257.e1210.
313. Martinez JA, Chalasani P, Thomson CA, Roe D, Altbach M, Galons JP, Stopeck A, Thompson PA, Villa-Guillen DE, Chow HH. (2016) Phase II study of metformin for reduction of obesity-associated breast cancer risk: a randomized controlled trial protocol. *BMC Cancer*, 16: 500.
314. Ligibel JA, Strickler HD. (2013) Obesity and its impact on breast cancer: tumor incidence, recurrence, survival, and possible interventions. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*: 52-59.

315. Demas DM, Demo S, Fallah Y, Clarke R, Nephew KP, Althouse S, Sandusky G, He W, Shajahan-Haq AN. (2019) Glutamine Metabolism Drives Growth in Advanced Hormone Receptor Positive Breast Cancer. *Front Oncol*, 9: 686.
316. Menendez JA, Lupu R. (2017) Fatty acid synthase (FASN) as a therapeutic target in breast cancer. *Expert Opin Ther Targets*, 21: 1001-1016.
317. Altman BJ, Stine ZE, Dang CV. (2016) From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 16: 619-634.
318. Matre P, Velez J, Jacamo R, Qi Y, Su X, Cai T, Chan SM, Lodi A, Sweeney SR, Ma H, Davis RE, Baran N, Haferlach T, Su X, Flores ER, Gonzalez D, Konoplev S, Samudio I, DiNardo C, Majeti R, Schimmer AD, Li W, Wang T, Tiziani S, Konopleva M. (2016) Inhibiting glutaminase in acute myeloid leukemia: metabolic dependency of selected AML subtypes. *Oncotarget*, 7: 79722-79735.
319. Nagana Gowda GA, Barding GA, Jr., Dai J, Gu H, Margineantu DH, Hockenbery DM, Raftery D. (2018) A Metabolomics Study of BPTES Altered Metabolism in Human Breast Cancer Cell Lines. *Front Mol Biosci*, 5: 49.
320. Feng WW, Wilkins O, Bang S, Ung M, Li J, An J, del Genio C, Canfield K, DiRenzo J, Wells W, Gaur A, Robey RB, Guo JY, Powles RL, Sotiriou C, Pusztai L, Febbraio M, Cheng C, Kinlaw WB, Kurokawa M. (2019) CD36-Mediated Metabolic Rewiring of Breast Cancer Cells Promotes Resistance to HER2-Targeted Therapies. *Cell Reports*, 29: 3405-3420.e3405.
321. Yan C, Wei H, Minjuan Z, Yan X, Jingyue Y, Wenchao L, Sheng H. (2014) The mTOR Inhibitor Rapamycin Synergizes with a Fatty Acid Synthase Inhibitor to Induce Cytotoxicity in ER/HER2-Positive Breast Cancer Cells. *PLOS ONE*, 9: e97697.
322. Cao Y. (2019) Adipocyte and lipid metabolism in cancer drug resistance. *J Clin Invest*, 129: 3006-3017.
323. Fiorillo M, Sotgia F, Lisanti MP. (2019) “Energetic” Cancer Stem Cells (e-CSCs): A New Hyper-Metabolic and Proliferative Tumor Cell Phenotype, Driven by Mitochondrial Energy. *Frontiers in Oncology*, 8.
324. Gaude E, Frezza C. (2016) Tissue-specific and convergent metabolic transformation of cancer correlates with metastatic potential and patient survival. *Nat Commun*, 7: 13041.

325. Paudel BB, Quaranta V. (2019) Metabolic plasticity meets gene regulation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 116: 3370-3372.

10 Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények:

1.) **Petővári G**, Hujber Z, Krencz I, Dankó T, Nagy N, Tóth F, Raffay R, Mészáros K, Rajnai H, Vetlényi E, Takács-Vellai K, Jeney A, Sebestyén A. Targeting cellular metabolism using rapamycin and/or doxycycline enhances anti-tumour effects in human glioma cells. *Cancer Cell Int.* 2018 Dec 19;18:211. doi: 10.1186/s12935-018-0710-0. eCollection 2018. **IF: 3,439**

2.) **Petővári G**, Dankó T, Krencz I, Hujber Z, Rajnai H, Vetlényi E, Raffay R, Pápay J, Jeney A, Sebestyén A. Inhibition of Metabolic Shift can Decrease Therapy Resistance in Human High-Grade Glioma Cells. *Pathol Oncol Res.* 2019 Jun 11. doi: 10.1007/s12253-019-00677-2. **IF: 2,433**

3.) 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**

4.) 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: 5,646**

5.) **Petővári G**, Dankó T, Tőkés AM, Vetlényi E, Krencz I, Raffay R, Hajdu M, Sztankovics D, Vellai-Takács K, Jeney A, Kulka J and Sebestyén A. *In situ* metabolic characterisation of breast cancer and its potential impact on therapy. **Under review**

A disszertációtól független 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.) Sticz T, Molnár A, Dankó T, Hujber Z, **Petővári G**, Nagy N, Végső G, Kopper L, Sebestyén A. The Effects of Different mTOR Inhibitors in EGFR Inhibitor Resistant

Colon Carcinoma Cells.Pathol Oncol Res. 2019 Oct;25(4):1379-1386. doi:
10.1007/s12253-018-0434-4. Epub 2018 Jun 7. **IF: 2,433**

11 Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Sebestyén Annának, aki először Tudományos Diákköri, majd Ph.D. hallgatói munkámban mindvégig mellettem áll, tanít, támogat, és biztosítja fejlődésemhez és kutatásomhoz a szükséges feltételeket. Kutatói szemlélete, tudományos tapasztalatai formálták tudományos gondolkodásomat és szakmai felkészültségemet.

Köszönöm Dr. Matolcsy András intézetvezetőnek és Dr. Kovalszky Ilona korábbi Doktori Iskola vezetőjének, hogy Ph.D. kutatásaimat az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben végezhettem.

Köszönettel tartozom, Dr. Jeney Andrásnak, Dr. Kopper Lászlónak és Vellai-Takács Krisztinának, hogy ötleteikkel és tanácsaikkal támogattak.

Köszönöm a Tumorbiológiai labor jelenlegi és volt munkatársainak a családi és baráti légkört, a rengeteg segítséget és szakmai tanácsokat: Dr. Hajdu Melinda, Dr. Nagy Noémi, Dr. Vetlényi Enikő, Dr. Krencz Ildikó, Dankó Titanilla, Dr. Hujber Zoltán, Sztankovics Dániel és végül, de nem utolsó sorban Raffay Reginának, aki grafikai megoldásaival színesítette munkám palettáját. Köszönöm a biokémia és a patomorfológiai labor segítségét.

Hálával gondolok Csorba Gézánéra a sejt- és szövettenyésztési technikák tanításáért.

Ugyancsak köszönettel tartozom Dankó Titanillának a rengeteg lektorálási és kísérletbeni segítségéért.

Köszönöm Dr. Kulka Janinának és Tőkés Anna Máriának az emlődaganat minták gyűjtésében és kiértékelésében nyújtott segítségét.

Szeretném megköszönni Dr. Mészáros Katalinnak és Dr. Szoboszlai Norbertnek a kromatográfiai-tömegspektrometriai mérésekben és Pálóczy Krisztinának egyéb vizsgálatokban nyújtott rengeteg segítséget. Dr. Buzás Editnek, Dr. Patócs Attilának, Dr. Tretter Lászlónak és Dr. Drahos Lászlónak a munkámhoz nyújtott támogatásukat.

Köszönet Dr. Barna Gábornak az áramlási citometriai mérésekben való segítségéért.

Köszönettel tartozom Dr. William P. Leendersnek, hogy rendelkezésünkre bocsájtotta az U251 MG glioma sejt vonal párt.

A patológiai kiértékelésben nyújtott fáradhatatlan segítséget köszönöm Dr. Hajdu Melindának, Dr. Rajnai Hajnáknak, Dr. Krencz Ildikónak, és Dr. Vetlényi Enikőnek.

Köszönettel tartozom Dr. Krenács Tibornak, hogy elvállalta dolgozatom házi bírálatát.

Köszönetemet szeretném kifejezni az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet valamennyi munkatársának a sok segítségért és támogatásért többek között az Kaminszky Zsuzsának és Sztodola Andrásnak az állatkísérletekben nyújtott segítségéért.

Hálás vagyok barátaimnak, akik végig mellettem álltak és hittek bennem.

Nagyon hálás vagyok Édesanyámnak, Édesapámnak, Húgomnak, családtagjaimnak, akik mindvégig mellettem álltak, támogattak, hittek bennem és sok-sok türelemmel kísérték munkámat, nélkülük nem tartanék itt.

PRIMARY RESEARCH

Open Access



Targeting cellular metabolism using rapamycin and/or doxycycline enhances anti-tumour effects in human glioma cells

Gábor Petővári¹, Zoltán Hujber¹, Ildikó Krencz¹, Titanilla Dankó¹, Noémi Nagy¹, Fanni Tóth¹, Regina Raffay¹, Katalin Mészáros², Hajnalka Rajnai¹, Enikő Vetlényi¹, Krisztina Takács-Vellai³, András Jeney¹ and Anna Sebestyén^{1*}

Abstract

Background: Glioma is the most common highly aggressive, primary adult brain tumour. Clinical data show that therapeutic approaches cannot reach the expectations in patients, thus gliomas are mainly incurable diseases. Tumour cells can adapt rapidly to alterations during therapeutic treatments related to their metabolic rewiring and profound heterogeneity in tissue environment. Renewed interests aim to develop effective treatments targeting angiogenesis, kinase activity and/or cellular metabolism. mTOR (mammalian target of rapamycin), whose hyperactivation is characteristic for many tumours, promotes metabolic alterations, macromolecule biosynthesis, cellular growth and survival. Unfortunately, mTOR inhibitors with their lower toxicity have not resulted in appreciable survival benefit. Analysing mTOR inhibitor sensitivity, other metabolism targeting treatments and their combinations could help to find potential agents and biomarkers for therapeutic development in glioma patients.

Methods: In vitro proliferation assays, protein expression and metabolite concentration analyses were used to study the effects of mTOR inhibitors, other metabolic treatments and their combinations in glioma cell lines. Furthermore, mTOR activity and cellular metabolism related protein expression patterns were also investigated by immunohistochemistry in human biopsies. Temozolomide and/or rapamycin treatments altered the expressions of enzymes related to lipid synthesis, glycolysis and mitochondrial functions as consequences of metabolic adaptation; therefore, other anti-metabolic drugs (chloroquine, etomoxir, doxycycline) were combined in vitro.

Results: Our results suggest that co-targeting metabolic pathways had tumour cell dependent additive/synergistic effects related to mTOR and metabolic protein expression patterns cell line dependently. Drug combinations, especially rapamycin + doxycycline may have promising anti-tumour effect in gliomas. Additionally, our immunohistochemistry results suggest that metabolic and mTOR activity alterations are not related to the recent glioma classification, and these protein expression profiles show individual differences in patients' materials.

Conclusions: Based on these, combinations of different new/old drugs targeting cellular metabolism could be promising to inhibit high adaptation capacity of tumour cells depending on their metabolic shifts. Relating to this, such a development of current therapy needs to find special biomarkers to characterise metabolic heterogeneity of gliomas.

Keywords: Glioblastoma, mTOR inhibitor, Anti-metabolic drug combinations, Tumour metabolism, Rapamycin, Doxycycline, Temozolomide

*Correspondence: anna@korb1.sote.hu; hsebanna@gmail.com

¹ 1st Department of Pathology and Experimental Cancer Research, Semmelweis University, Üllői út 26, Budapest 1085, Hungary
Full list of author information is available at the end of the article



Background

Glioma is the most common highly aggressive, primary adult brain tumour. Based on the World Health Organization (WHO) Classification of Central Nervous System Tumours, both low grade and high grade gliomas can be divided into two categories according to the presence or absence of IDH1/2 mutations. This classification also has a prognostic significance—IDH-mutant gliomas confer significantly improved prognosis compared to IDH wild-type tumours. Testing for 1p/19q-codeletion status is required for further classification of low grade gliomas. As a consequence of an unbalanced translocation between chromosomes 1 and 19, whole-arm deletions of 1p and 19q arms are characteristic for oligodendroglial tumours. Other molecular alterations can also occur in gliomas such as EGFR amplification, p16/14 deletion, Notch overexpression, NF-1/PTEN co-deletion or other mutations e.g. EGFR, PDGFRA, PI3KCA, PTEN, CDKN2A/B and p53 [1, 2]. The recent treatments with surgical resection, followed by adjuvant radiation and chemotherapy—typically with temozolomide—result in 15-month median overall survival, with two-year relative survival rate in less than 30% of cases [3]. Other lower grade gliomas have better prognosis (median survival rate is approximately 5 years), however, recently gliomas have been considered as mainly incurable diseases. These led to continuous interest to develop more effective treatments targeting for example malignancy related angiogenesis [4], kinase activity and cellular metabolism [5, 6].

Tumour cells can adapt rapidly to alterations in tissue environment and therapeutic treatments depending on their metabolic shifts and profound heterogeneity [7]. To fuel energy-, macromolecule production and build new cells different metabolic rewiring processes are needed during tumour progression such as orchestrating TCA cycle, oxidative phosphorylation (OXPHOS), pentose-phosphate pathway, amino-acid and lipid synthesis etc. (DeBerardinis and Chandel summarise highlighted metabolic pathways implicated in tumour metabolism [7]). The consequence of oncogenic alterations influences the glycolytic-, glutaminolytic activity, mitochondrial OXPHOS, lipid metabolism and the expression/activity of related enzymes in cellular metabolic network. The expression and activity of the participating enzymes can mark metabolic alterations at cellular level. The glycolytic activity or mitochondrial OXPHOS capacity can be followed by the expression changes of hexokinase 2—HK2, phosphofructokinase—PFKP, lactate dehydrogenase A—LDHA, lactate dehydrogenase B—LDHB or β -F1-ATP synthase— β -F1-ATPase etc. Lipid metabolism is influenced by lipid synthesis and oxidation (can be characterised by the expression or activity of fatty acid synthase—FASN; acyl-coenzyme A synthetase short-chain

family member 2—ACSS2; carnitine palmitoyltransferase 1A—CPT1a etc.). Glutamine consumption is characteristic for many tumours with increased glutaminase (GLS) expression [8, 9]. In parallel, intracellular metabolite concentrations (e.g. the main glycolytic product—lactate or other TCA metabolites—such as malate, pyruvate etc., the measured metabolites by the current study will included in a figure of the results section), several substrate transporter protein expressions (as glucose, glutamine and monocarboxylate transporters) and their activity could also be changed [10]. Based on the previously described metabolic enzyme expression alterations, recently there has been an increasing interest to target metabolism regulating pathways or metabolic enzymes in gliomas and other tumours [11].

mTOR kinase hyper-activation—which often occurs in different tumours—is linked mainly to PI3K/Akt signalling activation and alters cellular metabolism, protein turnover, cell growth and survival. mTOR kinase exists in two different complexes with characteristic proteins (such as Raptor and Rictor in mTORC1 and C2, respectively) and targets (S6K1, 4EBP1, SREBP1, ULK1, Akt etc.) [12]. mTORC1 controls anabolic processes such as protein synthesis and cell cycle entry in response to cellular energy, growth factor and nutrient availability. mTORC2—which is mainly influenced by growth factors—phosphorylates different downstream targets such as members of the AGC kinase family, Akt, serum/glucocorticoid regulated kinase (SGK) and protein kinase C (PKC) to promote lipogenesis, glucose uptake, glycolysis and cell survival [13].

The expression of several mTOR and metabolism related genes in normal human brain tissues has been studied previously at RNA and protein levels. According to immunohistochemistry studies and Protein Atlas expression database, ACSS2, ACSL1 (long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1), CPT1a, GLS and additionally mTOR, Rictor expressions are low or undetectable (1+/0) in glial cells. Only S6 and Akt protein expressions were evaluated a slightly higher level (maximum 2+) in normal human glial cells. In other neuronal cells relatively higher mTOR, S6, Akt, ACSL1 and GLS expression levels have been detected.

Several phase I and phase II trials using mTOR inhibitors have been tested in mono-therapy and/or studied in standard chemo-radiation, however, these have not resulted in appreciable survival benefit [14, 15]. Combining anti-EGFR or anti-VEGF therapy with mTORI treatments could have certain significant benefits, however, these also have no real success. Recently it has also been described that the effects of rapalog (sirolimus) and temozolomide could be enhanced for example by chloroquine (an autophagy inhibitor) [16]. Despite these trials,

GBM is still incurable which may be the consequence of glioma cell survival, metabolic plasticity and heterogeneity in developing glioma tissues [11, 14].

In our study, differences in mTOR inhibitor sensitivity in correlation to mTOR activity and other metabolic treatment combinations were studied using three human in vitro cultured glioma cell lines. Using mTOR inhibitors, temozolomide and other metabolic inhibitors (such as inhibitors of autophagy, beta-oxidation and mitochondrial functions) showed individual—cell line dependent—metabolic alterations in our mono-treatment study. Based on these, further two- or three-drug combinations were also tested; and the results suggest that co-targeting these different metabolic pathways—especially by rapamycin + doxycycline combinations—may have therapeutic benefits. In addition, for such targeting special biomarkers and the characterisation of metabolic heterogeneity of in vivo gliomas are needed as a part of personalised therapy, where side-effects have to also be considered.

Materials and methods

All materials were purchased from Merck-Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany), except where it is indicated in the text.

Cell cultures and different reagents

U251 (ECACC-09063001, characteristic glioma cell specific mutations in PTEN, NF-1, p53, MSH2), U87 (ATCC-HTB-14, characteristic glioma cell specific mutations in PTEN, NF-1 and Notch-2), U373 Uppsala (U373-U; ECACC-08061901) human glioma cells were cultured and treated in DMEM high glucose medium supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS; HyClone), 2 mM L-glutamine and 100 UI/mL penicillin–streptomycin at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere.

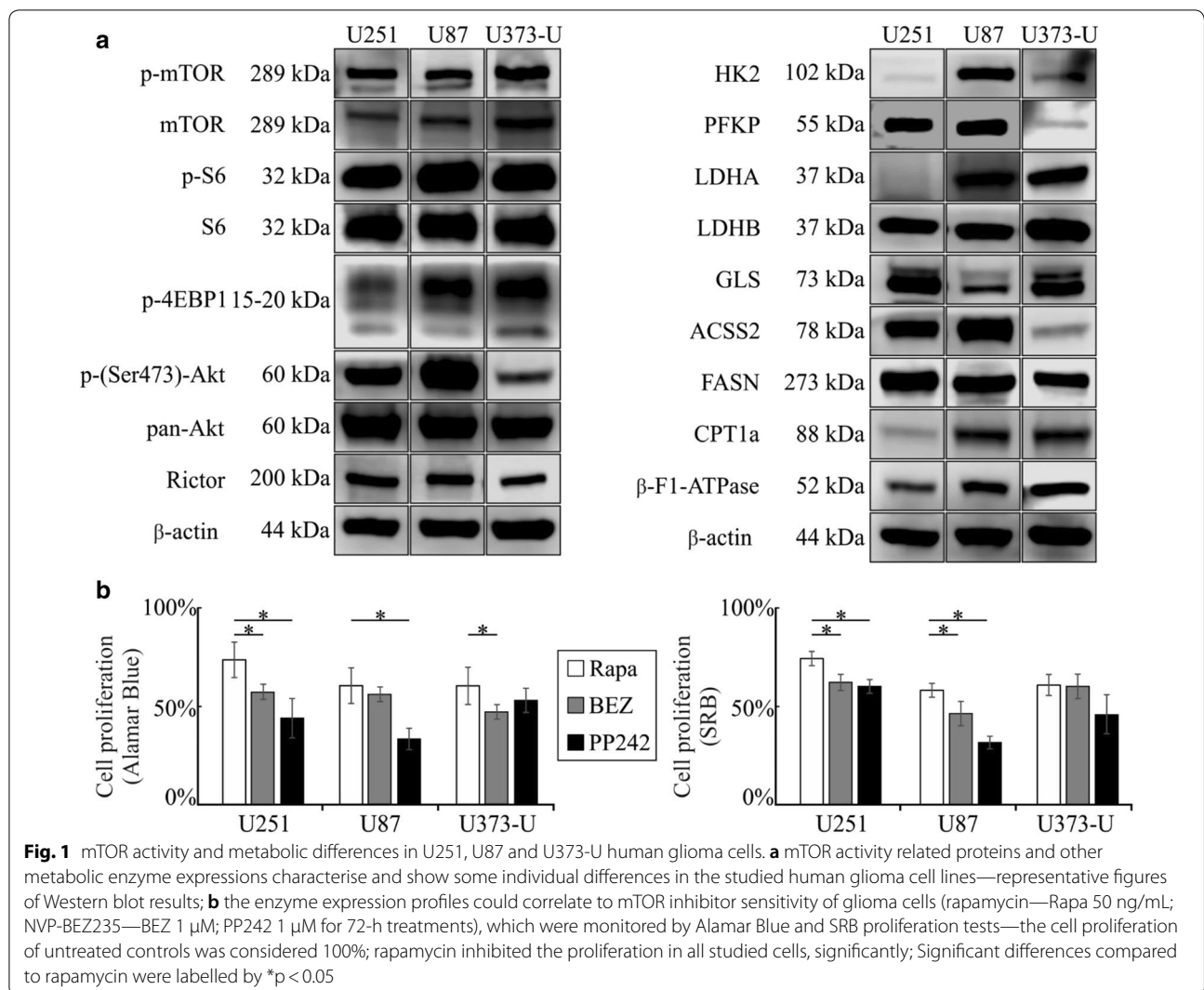
Using different assays cells were plated onto 96-well plates (2–5 × 10³ cells/well for proliferation tests) or into T25 flasks (3–6 × 10⁵ cells/flask—for LC–MS and Western blot experiments) and treated with different drugs and their combinations (rapamycin—Rapa, 50 ng/mL; NVP-BEZ235—BEZ, 1 μM, Cayman; PP242—1 μM, Tocris; doxycycline—Doxy, 10 μM; temozolomide—TMZ, 100 μM; etomoxir—Etom, 50 μM; and chloroquine—Chl, 50 μM) for 72 h, in combinations different drugs were added at the same time to the cell cultures. 1% DMSO was added to control cells and was used as a vehicle for some of the compounds as it was required. The concentration of the used mTOR inhibitors (Rapa, BEZ and PP242) was applied based on our previous publications [17, 18]. To study the effect of drug combinations lower dose than IC₅₀ was applied in case of used metabolic or other inhibitors, these drug concentrations were defined by using others' previous IC₅₀ data and our preliminary

experimental work in gliomas or other cancer types [19–22]. Alamar Blue (Thermo Fisher Scientific) and SRB tests were used to determine the anti-proliferative effects. At the end of different in vitro treatments a 4-h incubation period was performed with Alamar Blue. Fluorescence was measured in the 570–590 nm range by Ascent software (Fluoroskan Ascent FL fluorimeter; Labsystems International). In SRB assay, after 10% trichloroacetic acid fixation the cells were incubated with sulforhodamine B (15 min, 0.4 m/v%) following 10 mM Tris base addition. The absorbance was measured at 570 nm in a microplate reader. Percentage of the cell proliferation was given relative to control samples. At the beginning of experimental workflow both proliferation assays were performed and cell numbers were also followed after different treatments. No significant alterations were detected between the effects using different assays—these similarities were shown in Figs. 1 and 2.

To analyse the additive or synergistic effects of different drug combinations Combination Index (CI) was used [23]. The CI was calculated as $\frac{EA+EB}{EAB}$, where EA and EB were the individual effects of the mono-therapy and EAB was the observed combination effect. CI is within 0 and 1 means that the combined drugs have no additional effect on cells, in case CI is 1 indicates additive and above 1 synergistic effect, respectively.

Metabolite analysis using liquid chromatography–mass spectrometry

Intracellular metabolites—lactate, pyruvate, citrate, α-ketoglutarate (AKG), succinate, fumarate, malate, glutamate, aspartate—were extracted based on Szoboszlai et al. with some modifications [24, 25]. Intermediates were extracted from cells and supernatants by methanol-chloroform-water (9:1:1) and vortexed at 4 °C. After centrifugation (15,000×g, 10 min, 4 °C) supernatants were stored at –80 °C until liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) measurements. The concentrations of lactate, pyruvate, citrate, AKG, succinate, fumarate, malate, glutamate and aspartate were assessed by using calibration curves obtained with the dilution of analytical grade standards in the range of 0.5–50 μM and the given ng/10⁶ cells concentrations were used in ratio calculation. LC–MS assays were used by Perkin-Elmer Flexar FX10 ultra-performance liquid chromatograph coupled with a Sciex 5500 QTRAP mass spectrometer. Chromatographic separation was carried out on a Phenomenex Luna Omega C18 column (100 × 2.1 mm, 1.6 μm) (GenLab Ltd., Budapest, Hungary). The mobile phase consisted of water and methanol containing 0.1% (v/v) formic acid. The MS was operating in negative electrospray ionisation mode. For the measurements the



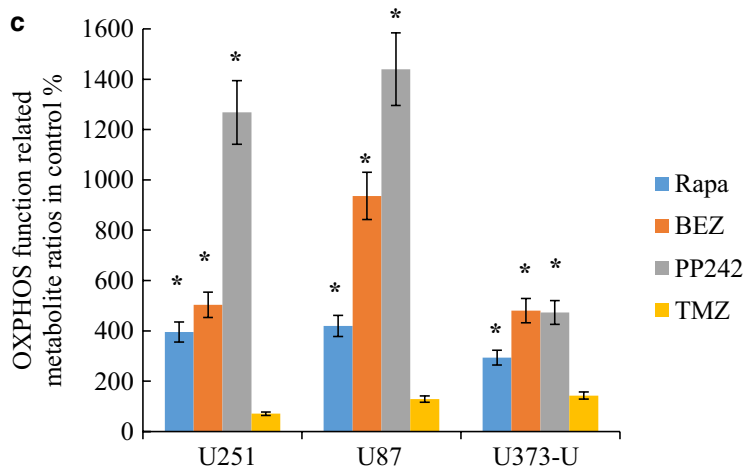
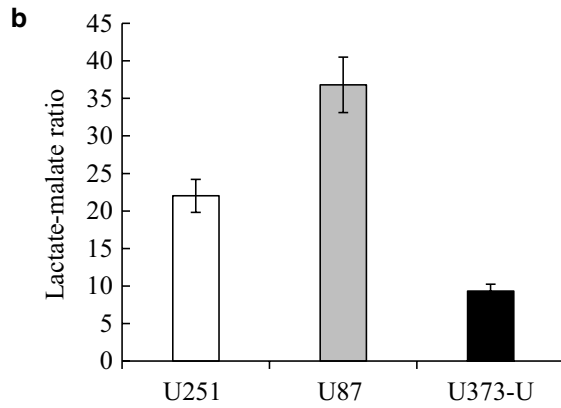
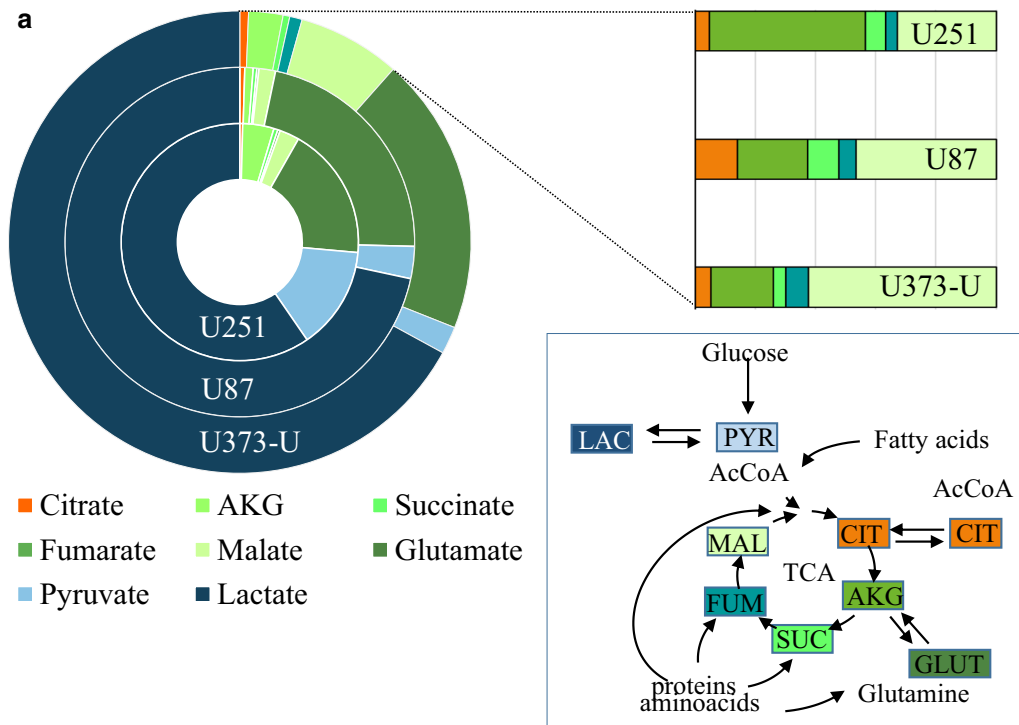
following settings were adjusted—source temperature: 300 °C ionisation voltage: – 4000 V, entrance potential: – 10 V, curtain gas: 35 psi, gas1: 35 psi, gas2: 35 psi, CAD gas: medium. Multiple reaction monitoring (MRM) mode was applied to perform quantitative analyses.

Expression analysis of mTOR and metabolic proteins by Western blot

Protein extracts were lysed (50 mM Tris, 10% glycerol, 150 mM NaCl, 1% Nonidet-P40, 10 mM NaF, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5 mM NaVO₃, pH 7.5) from at least 1 × 10⁶ cells and quantitated using Bradford protein reagent (BioRad) for Western blot analysis using

(See figure on next page.)

Fig. 2 Intracellular metabolite concentrations in the studied three glioma cell lines. **a** High level of intracellular lactate or glutamate and differences in the concentration of other metabolites, such as pyruvate and several TCA cycle metabolites—metabolites were measured by LC–MS and the relative distributions of the detected LAC lactate, PYR pyruvate, CIT citrate, AKG α-ketoglutarate, SUC succinate, FUM fumarate, MAL malate, GLUT glutamate were given; **b** the highest lactate/malate ratio showed the highest glycolytic activity in U87 cells; **c** alterations in metabolite levels measured by LC–MS after 72-h mTORI and temozolomide treatments—(citrate/pyruvate)/(fumarate/succinate) ratios were given in untreated controls % to characterise OXPHOS function. Drugs were used in the following concentrations—rapamycin—Rapa 50 ng/mL; NVP-BEZ235—BEZ 1 μM; PP242 1 μM; temozolomide—TMZ 100 μM. Significant changes were labelled * (p < 0.05)



sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. After wet transfer PVDF membranes (BioRad) were incubated with the following antibodies: anti-phospho-mTOR (Ser2448) (p-mTOR; 1:1000; #2971, Cell Signaling Technology—CST), anti-mTOR (mTOR; 1:1000; #2972, CST), anti-phospho-S6 (Ser 235/236) (p-S6; 1:1000; #4858, CST), anti-S6 (S6; 1:1000; #2317, CST), anti-phospho-4E-binding protein 1 (Thr37/46) (p-4EBP1; 1:1000; #2855, CST), anti-Rictor (1:1000; #2140, CST), anti-phospho-Akt (p-(Ser 473)-Akt; 1:2000; #4060, CST), anti-Akt (pan) (pan-Akt; 1:1000; #4691, CST) anti-lactate dehydrogenase A (LDHA; 1:1000; #3582, CST), anti-lactate dehydrogenase B (LDHB; 1:2000; #85319, Abcam) anti-glutaminase (GLS; 1:1000; #15676, Abcam), anti-carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1a; 1:1000; #128568, Abcam), anti-fatty acid synthase (FASN; 1:1000; #3180, CST) anti-acyl-coenzyme A synthetase short-chain family member 2 (ACSS2; 1:1000; #3658, CST), anti-hexokinase 2 (HK2; 1:1000; #2867, CST), anti-phosphofruktokinase (PFKP; 1:1000; #8164, CST) anti- β -F1-ATP synthase (β -F1-ATPase; 1:2000; #14730, Abcam) anti-pyruvate dehydrogenase (PDH; 1:1000; #3205, CST) and anti- β -actin (1:5000; #A2228, Sigma-Aldrich) were used as loading control. At the end biotinylated secondary antibodies, avidin-HRP complex (Vectastain Elite ABC Kit, Vector) and enhanced chemiluminescence technique (Pierce ECL Western Blotting Substrate using Li-Cor-C-Digit) were applied and the expression of proteins was quantitated by Image Studio Digits program.

Patients, tissue samples and immunohistochemistry

Isocitrate dehydrogenase (IDH) wild-type ($n=10$), IDH-mutant ($n=8$) human glioblastoma and high-grade astrocytoma tissues were studied, two cases harboured 1p19q trisomy or tetrasomy. Samples were obtained by surgical resection at National Institute of Clinical Neurosciences (Budapest), between January 1, 2014 and December 31, 2015. Peritumoral brain tissue ($n=2$) was also analysed as control. The archived FFPE tissue blocks were used with the approval of the Hungarian Scientific Council National Ethics Committee for Scientific Research (No. 7/2006). All cases were re-reviewed and re-classified based on The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System [1].

Immunohistochemistry was performed on tissue microarrays (TMAs) with double scores per patients. Representative areas were selected by a neuropathologist for TMA construction. After deparaffinization, the tissue sections underwent antigen retrieval (citrate buffer pH 6, in a pressure cooker). Slides were incubated with the appropriate primary antibodies which were used in Western blot analyses to detect LDHA, GLS, CPT1a,

FASN, ACSS2, HK2 or were established previously to detect p-mTOR activity related proteins (p-mTOR Ser2448—1:100; #2976, CST; p-S6 Ser 235/236—1:100; #2211, CST; Rictor -1:1000 A500-002A, Bethyl; phospho-Akt (p-(Ser473)-Akt—1:100; #4060, CST) at room temperature for 90 min, followed by Novolink Polymer Detection System (Novocastra, Wetzlar, Germany), DAB (Dako) chromogen and haematoxylin counterstaining. A scale of 0–3 was used for semiquantitative analysis of immunoreactivity by two independent pathologists (using Panoramic Viewer Software—3D Histech) as following: no staining, 0; weak staining, 1+; intermediate staining, 2+; and strong staining, 3+.

Statistical analysis

The data are presented as mean \pm SD deviation and calculated from three independent experiments with at least three or more parallels, depending on the used method. Data evaluation of in vitro experiments was performed using Student's *t* (two-tailed) test and one-way analysis of variance (ANOVA). IBM SPSS software (version 22; SPSS Inc, Chicago, IL) was used to evaluate multiple comparisons. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Differences in metabolic enzyme expressions and mTORI sensitivity in human glioma cells

The studied IDH wild-type glioma cell lines with different known oncogenic mutations (see in methods) showed high mTOR activity, due to well-known characteristics of PTEN loss and/or PI3K/Akt hyper-activation. High expression levels of proteins related to both mTORC1 and C2 activity were characteristic for the studied glioma cells, especially p-S6, p-4EBP1 and p-(Ser473)-Akt. U373-U showed relatively lower Rictor and p-(Ser473)-Akt expressions than the others (U251 and U87 cells). After 72-h mTORI treatments we could detect certain significant anti-proliferative effects of mTORC1 inhibitor (rapamycin) and other dual (NVP-BEZ235—BEZ) or ATP competitive (PP242) mTOR inhibitors using Alamar Blue and SRB proliferation tests. In correlation to the lower Rictor and p-(Ser473)-Akt expression, PP242 (mTORC1 and C2 inhibitor) had no significantly higher anti-proliferative effect than rapamycin in U373-U cells, as expected. These results highlighted the known potential importance of slight differences in mTOR activity and mTORI sensitivity in glioma cells (Fig. 1a, b).

Analyses of other bioenergetic pathway related enzyme expression profiles (Fig. 1a) and intracellular metabolite concentrations in these cells revealed further differences. U251 and U373-U cells showed lower glycolytic capacity related to low HK2 and in parallel, altered PFKP/LDH expression patterns. U87 cells expressed higher level of

glycolytic enzymes than the other two cell lines. Individual GLS, ACSS2 and β -F1-ATPase expression levels were also detected. Moreover, FASN expression was relatively higher than CPT1a in all studied glioma cells which can be in correlation to the growing cell culture characteristics and metabolic shifts towards anabolic pathways (Fig. 1a).

Relating to the manifold potentially useful bioenergetic capacity, we measured high lactate, glutamate and detectable amount of TCA cycle metabolites in all studied cells by LC-MS. The intracellular lactate concentration, the lactate/malate ratio and its inverse correlation to pyruvate levels reflected to the protein expression profile of the related enzymes (HK2, LDHA, PKFP) (Figs. 1a, 2a). In our previous work the intracellular lactate/malate ratio was suggested as a potential metabolic marker [24, 25], these ratios showed the highest glycolytic activity in U87 cells and lower in U251 and U373-U cells (Fig. 2b).

mTORI and temozolomide induce metabolic alterations in glioma cells

It was suggested and described that mTORIs can sensitise gliomas to therapeutic temozolomide treatments. In this study, we tested the anti-proliferative effect of different mTORIs and temozolomide in combinations. Rapamycin was more effective than temozolomide in each cell line tested using Alamar Blue and SRB assays. Moreover, rapamycin + temozolomide combinations showed significantly enhanced anti-proliferative effects in the studied glioma cells as expected. Rapamycin + temozolomide combination was highly effective—synergistic—in U373-U glioma cells but this combination was less effective in the other two cells (U251, U87) (Fig. 3). We analysed the expressions of certain mTORC1 and C2 complex activity related proteins and other metabolic proteins after applying mTORIs or temozolomide. The effectivity of mTORIs was monitored by checking p-S6 and p-4EBP1 levels. These showed that all mTORIs reduced the phosphorylation of S6, however, in the studied cell lines mTORC1 and C2 inhibitors could only reduce the p-4EBP1 level. mTORIs resulted in downregulated HK2, GLS and

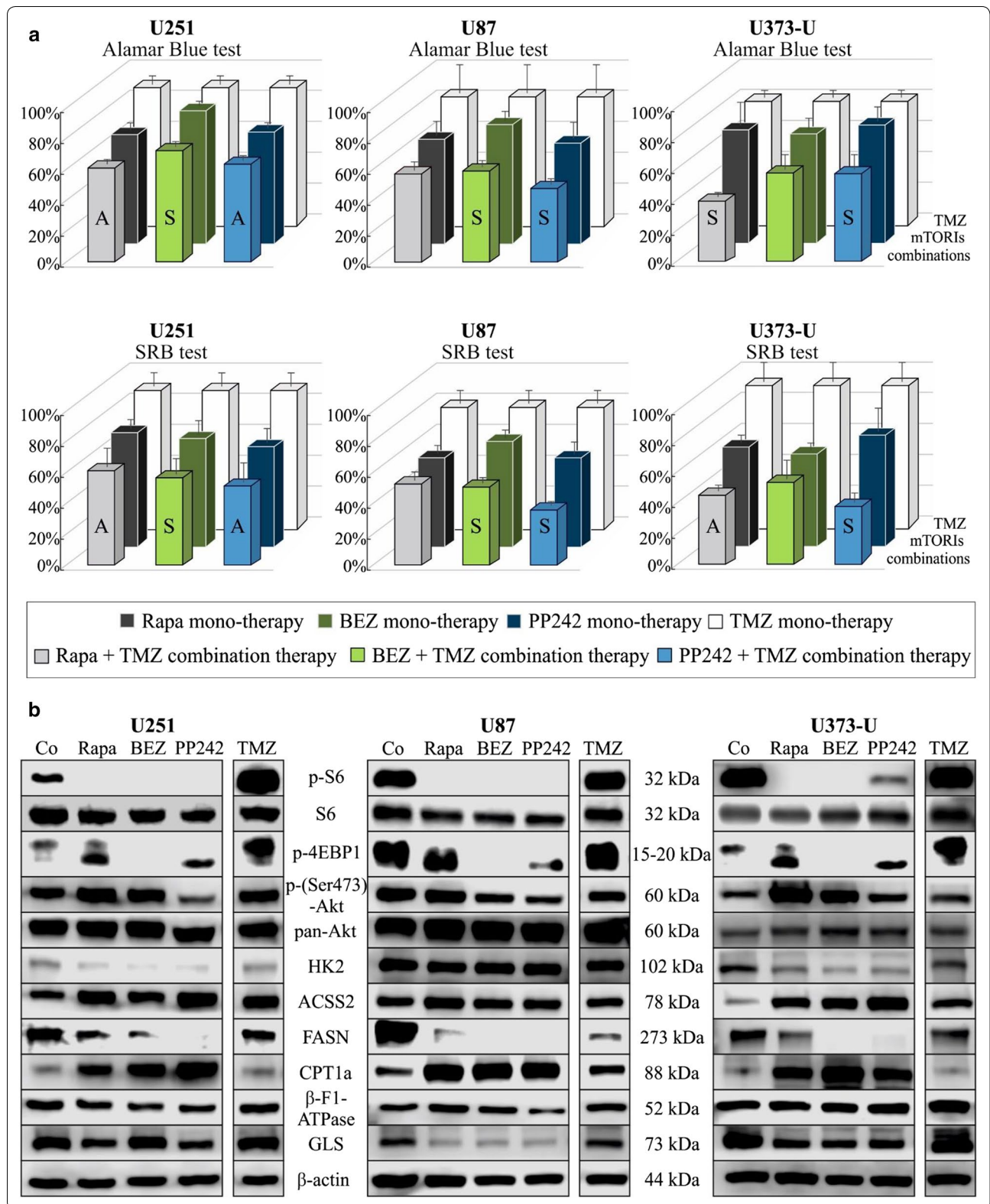
lipid synthesis enzyme (FASN) expression and in parallel upregulated beta-oxidation enzyme (CPT1a) and ACSS2 levels in a cell line dependent manner (e.g. GLS expression was not decreased after BEZ treatment in U251; and HK2 expression was not altered in U87 cells). These data correlate with inhibited mTORC1 functions in parallel with the altered expressions of certain studied glycolysis, glutaminolysis and lipid metabolism related enzymes. The rapamycin-mediated upregulation of mTORC2 complex activity (p-(Ser473)-Akt increase) was shown in U251 and U373-U cells, and this was not observed (p-(Ser473)-Akt expression was lower) with dual PI3K-mTOR inhibitors (neither BEZ nor PP242) in all cells (Fig. 3).

Temozolomide significantly elevated p-4EBP1 levels in glioma cells and increased S6 phosphorylation in U251 but this was decreased in U87 and U373-U cells in contrast to the effects of mTORIs. In addition, temozolomide decreased lipid synthesis related FASN without influencing CPT1a expression in the studied glioma cells (Fig. 3).

In our previous metabolic studies of other tumour cells, the lactate/malate ratio was suggested using as a part of metabolic characterisation. In the current study, after 72-h different mTORI and temozolomide treatments we found that concentration changes of other metabolites need to be also considered to follow and analyse the metabolic changes at cellular level. Concentrations of other glycolytic and TCA cycle metabolites (e.g. pyruvate, citrate, succinate and fumarate) were considered to reveal the sign of glycolytic-OXPHOS alterations. According to our data, the ratios of citrate/pyruvate and fumarate/succinate showed the inhibited glycolytic and induced mitochondrial oxidation processes (OXPHOS shift)—significant changes were shown in Fig. 2c. The sign of such a significant alteration which is characteristic for OXPHOS shift was not detected in response to temozolomide treatments. These findings are in line with the fact that enzyme expression profile alterations are not characteristic for inhibited glycolysis and induced oxidation response in temozolomide treated glioma cells (Fig. 3b).

(See figure on next page.)

Fig. 3 The anti-proliferative effects and alterations in mTOR activity and other metabolism related protein levels in response to mTORI and temozolomide treatments in human glioma cell lines. **a** mTOR inhibitors (rapamycin—Rapa 50 ng/mL; NVP-BEZ235—BEZ 1 μ M; PP242 1 μ M) and temozolomide (TMZ 100 μ M) 72-h combination treatments effectively inhibited the proliferation of U251, U87 and U373-U cells—Alamar Blue and SRB proliferation test results, the cell proliferation of untreated controls were considered 100% (temozolomide slightly reduced the proliferation and had no significant growth inhibitory effect on U251, mTORIs had similar effects as in Fig. 1a, and all temozolomide + mTORI combined treatments had significant anti-proliferative effects, $p < 0.05$; the additive (A) or synergistic (S) effects of inhibitor combinations were given based on CI calculation, SD was added); **b** altered expressions of mTORC1 and C2 activity related proteins and other metabolic enzymes were also shown after different mono-treatments (results of representative Western blots after 72-h treatments)



The effects of doxycycline, etomoxir and chloroquine in human glioma cells

Based on these alterations, other anti-metabolic treatments were also performed in our *in vitro* study; mitochondrial functions, lipid metabolism and autophagy were targeted. Slight anti-proliferative effects (10–25% reduction) of doxycycline (mitochondrial translation inhibitor using 10 μ M [29]), etomoxir (beta-oxidation inhibitor using 50 μ M) and chloroquine (autophagy inhibitor using 50 μ M) were detected in almost all 72-h mono-treatments *in vitro* (Fig. 4a). In response to the above treatments we could observe the following individual differences in protein expression patterns: (a) in parallel with low anti-proliferative effects, doxycycline decreased p-(Ser473)-Akt level in all cells, significantly increased ACSS2 expression in U251 and U373-U; (b) etomoxir treatments increased CPT1a and ACSS2 expressions—these alterations could compensate metabolic stress in case of inhibited lipid oxidation. Although etomoxir did not alter significantly any other investigated protein levels, neither mTOR activity related p-S6/p-(Ser473)-Akt nor others; (c) The autophagy inhibitor chloroquine decreased CPT1a level and increased FASN expression significantly in U373-U and U251 cells. Decrease in p-(Ser473)-Akt and ACSS2 expression levels were also detected in U251 and U87 cells after chloroquine treatments (Fig. 4b).

Effects of combined treatments

As drugs like doxycycline, etomoxir and chloroquine exerted lower effects in mono-therapy, we decided to combine them further to target the metabolic adaptation in temozolomide and rapamycin treatments. Our findings suggest that certain of these new two-drug combinations—such as temozolomide and rapalogs—had rather cell line dependent additive effects (Fig. 5) relating to mTOR activity and other metabolic enzyme expression patterns. While etomoxir/chloroquine in combination with rapamycin or temozolomide were less effective two-drug treatments; temozolomide + chloroquine and rapamycin + chloroquine combinations were additive in U251 and U373-U cells, respectively. Doxycycline increased the effect of rapamycin in all glioma cells (the effects were synergistic in U251 and U373-U cells), moreover, in U87 cells this antibiotic treatment could induce the effect of rapamycin + temozolomide treatment (see below), as well (nevertheless rapamycin + doxycycline combination was not synergistic in U87 cells).

In U251 cells, we compared p-S6, p-(Ser473)-Akt, FASN, CPT1a and β -F1-ATPase expression changes further after using two-drug (rapamycin + temozolomide/doxycycline or temozolomide + doxycycline) combinations (Fig. 4c). Our results suggest that these drug

combinations, especially rapamycin and doxycycline mutually affect the mechanism of each other's metabolic adaptation. In U251 cells p-S6 and p-(Ser473)-Akt expressions were reduced (Fig. 4c) in response to rapamycin + doxycycline/temozolomide combinations. However, lipid metabolism related enzymes did not follow these expression changes in correlation to lowered mTOR activity (CPT1a and FASN expressions were not significantly changed). Moreover, β -F1-ATPase expression (as a result of altered—collapsed—mitochondrial OXPHOS) was downregulated following these—rapamycin + temozolomide/doxycycline—two-drug treatments (Fig. 4c).

Furthermore, the effects of three-drug combinations exerted on proliferation were also tested in glioma cell lines. Based on our 72-h proliferation data, we found that the anti-proliferative effects of rapamycin + temozolomide treatments were significantly increased by adding doxycycline to U87 cells as it was described above. Rapamycin + temozolomide + doxycycline was effective, but could not induce the effect of either mono-therapy in U251 or U373-U. Other three-drug combinations also seemed to be very effective such as rapamycin + doxycycline + chloroquine/etomoxir in U373-U cells or temozolomide + doxycycline + chloroquine in U251 and U87 (Fig. 6).

Heterogeneity of metabolic protein expression in human glioma biopsies

Analysing the data of *in vitro* treatments and comparing these to the protein expression profiles of the cells suggest certain baseline protein expression differences in the studied cell lines. These could correlate to rapamycin + temozolomide effectivity or could help to find which other combinations can result tumour growth inhibition in less sensitive cell lines. *In vitro* cell lines do not necessarily reflect clinical tumours in all aspects; therefore, metabolic enzyme expressions were studied in human glioma biopsies and peritumoral normal brain tissues by immunohistochemistry, as well. We tested the expressions of certain proteins—which were previously analysed by Western blot—using immunohistochemistry *in situ* on human biopsy samples (10 wild-type and 8 IDH-mutant cases). Both intratumoral (see in Fig. 7 representative p-S6, p-Akt and FASN staining heterogeneity) and case dependent heterogeneous staining intensities were detected at tissue level. Beside the detected remarkable high mTOR activity—which showed intra- and intertumoral heterogeneity with average score 2+ of all mTOR complex expression and activity markers in the studied cases—high expression of CPT1a was detected in all studied human glioma cases compared to normal brain (high scores—3+—were evaluated in 17/18

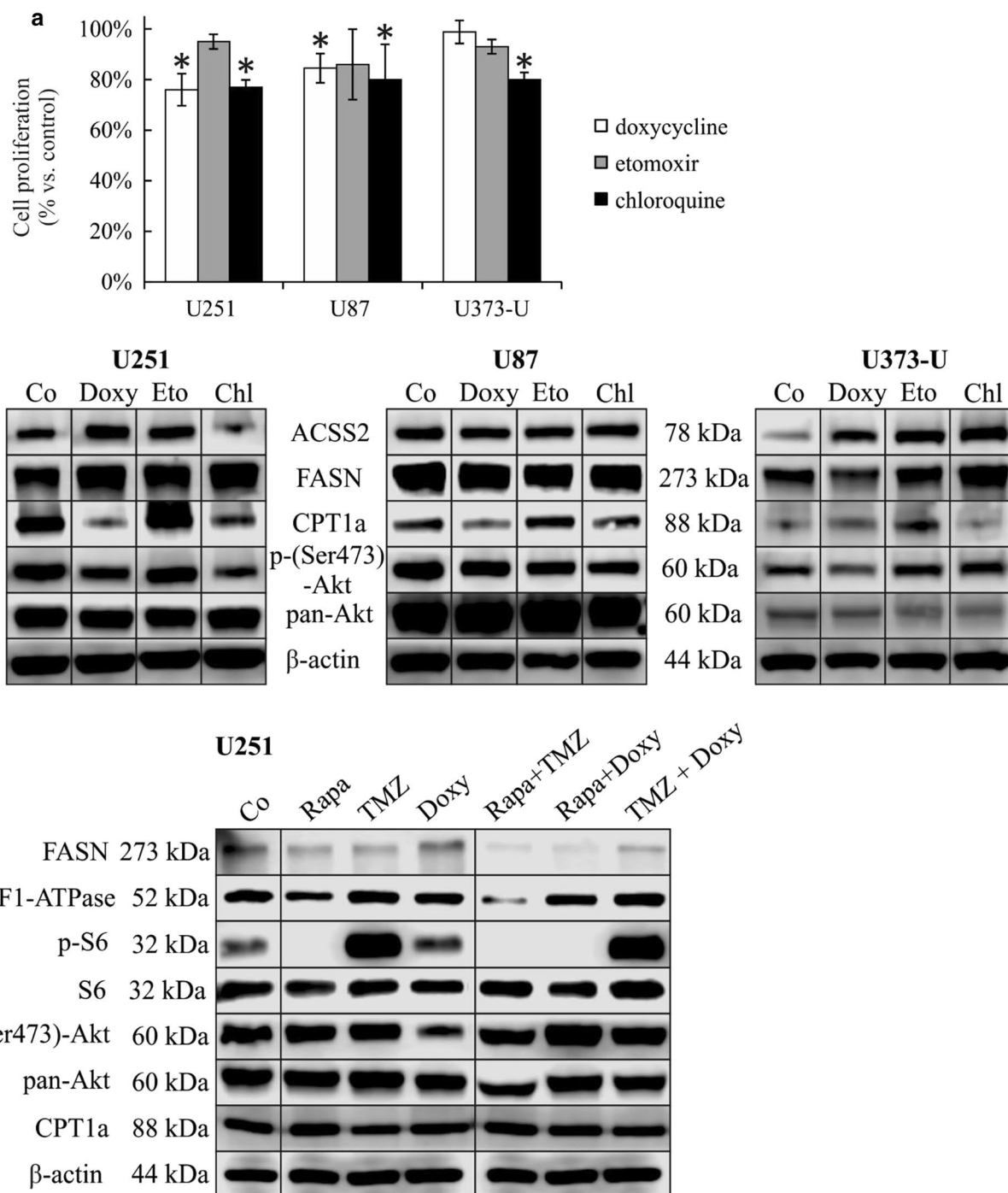


Fig. 4 Metabolic drugs induced proliferative and protein expression profile changes in human glioma cells. **a** Doxycycline (Doxy 10 μM), etomoxir (Eto 50 μM), chloroquine (Chl 50 μM) 72-h treatments have slight growth inhibitory effects in U251, U87 and U373-U (Alamar Blue proliferation test data; *p < 0.05); **b** ACSS2, FASN, CPT1a and p-(Ser473)-Akt protein expressions were influenced by rapamycin, doxycycline, etomoxir and chloroquine after 72-h mono-treatments; **c** FASN, β-F1-ATPase, p-S6, p-(Ser473)-Akt and CPT1a protein expression compared to the untreated controls after applying two-drug combinations in U251 glioma cells (50 ng/mL rapamycin + 100 μM temozolomide—Rapa + TMZ; 50 ng/mL rapamycin + 10 μM doxycycline—Rapa + Doxy; 100 μM temozolomide + 10 μM doxycycline—TMZ + Doxy (Western blot results)—representative Western blot figures

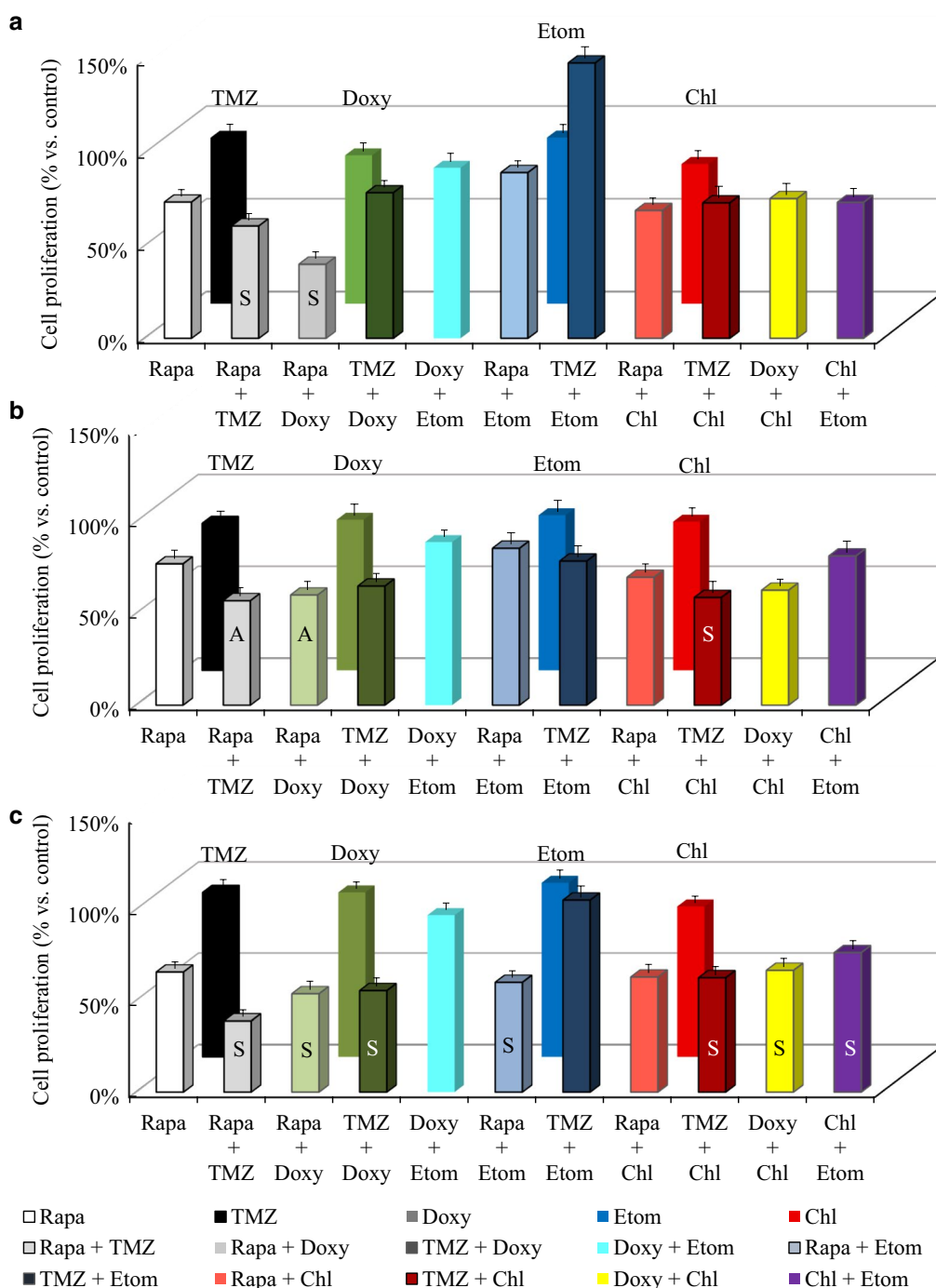
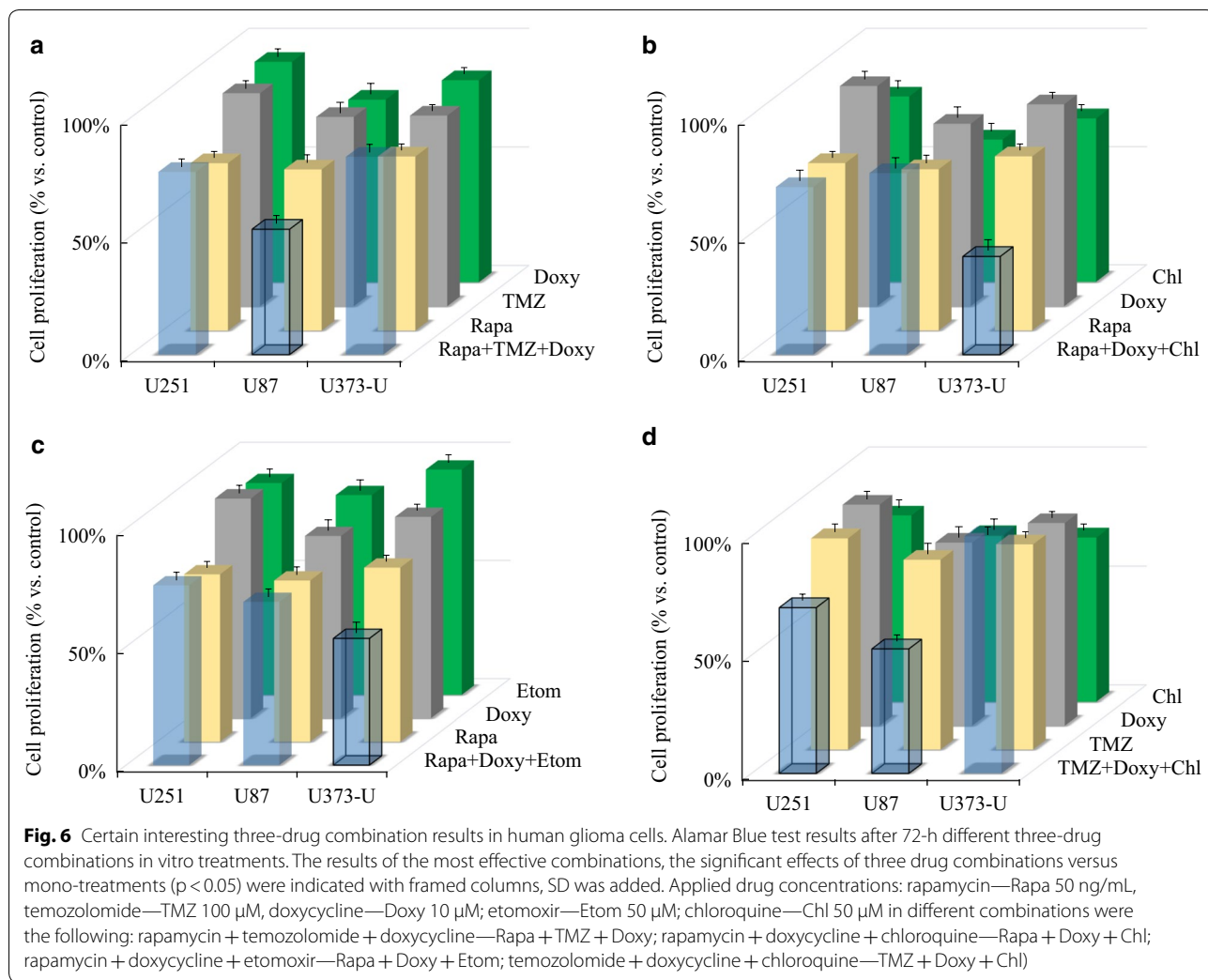


Fig. 5 Rapamycin and temozolomide combined with other metabolic inhibitors have different in vitro anti-proliferative effects in human glioma cell lines. Alamar Blue test results after 72-h different two-drug combined in vitro treatments in U251 (a), U87 (b) and U373-U (c) glioma cells (rapamycin—Rapa 50 ng/mL, temozolomide—TMZ 100 μM, doxycycline—Doxy 10 μM; etomoxir—Etom 50 μM; chloroquine—Chl 50 μM). The additive (A) or synergistic (S) effects of combinations were given based on CI calculation, SD was added, the anti-proliferative effects were significant ($p < 0.05$) in almost all combined treatments compared to untreated cultures except for doxycycline + etomoxir and temozolomide + etomoxir treatments



studied glioma cases Fig. 7). It was also concluded that ACSS2 and p-(Ser473)-Akt/Rictor expression differences showed high score variability among tumours; IHC staining intensities were scored between 1+ and 3+ in same grade IDH-mutant and wild-type tissues. Additionally, FASN expression was only overexpressed in some cases of the studied biopsy materials. However, GLS overexpression was characteristic for IDH-mutant rather than wild-type gliomas (GLS expression scores were 2/3+ in 6/8 IDH-mutant and 0/1+ in 8/10 studied IDH wild-type cases). The intratumoral heterogeneity in the expression pattern of the studied proteins and the higher anti-GLS staining intensities of IDH-mutant tumour tissues were shown in representative IHC figures (Fig. 7). An implication of these findings—the heterogeneity among the studied IDH wild-type cases—is that the clinical, therapeutic data of glioma cases should be studied in correlation to their in situ metabolic protein expression profiles, especially in case of mTORI and temozolomide treatment

resistant patients (e.g. tumour pairs before and after treatments).

Discussion

Recent standard therapies have certain limitations in terms of the special site in the background of blood–brain barrier, the genetic and tissue heterogeneity and the often developing resistance against different therapies of highly malignant and recurring gliomas [26]. To the present, PI3K/Akt/mTOR signalling beside EGFR is one of the most frequently targeted pathways in different solid tumours and gliomas [26, 27]. Clinical data show that the effects of recently used drugs on GBM patients cannot reach the expectations in stable diseases; e.g. relapses and moreover, on- and off-target effects of these high-dose long-term treatments cannot be tolerated by patients [26]. Dual PI3K/mTOR inhibitors show less toxicity in patients, furthermore, their clinical efficacy is mainly related to genetic alterations

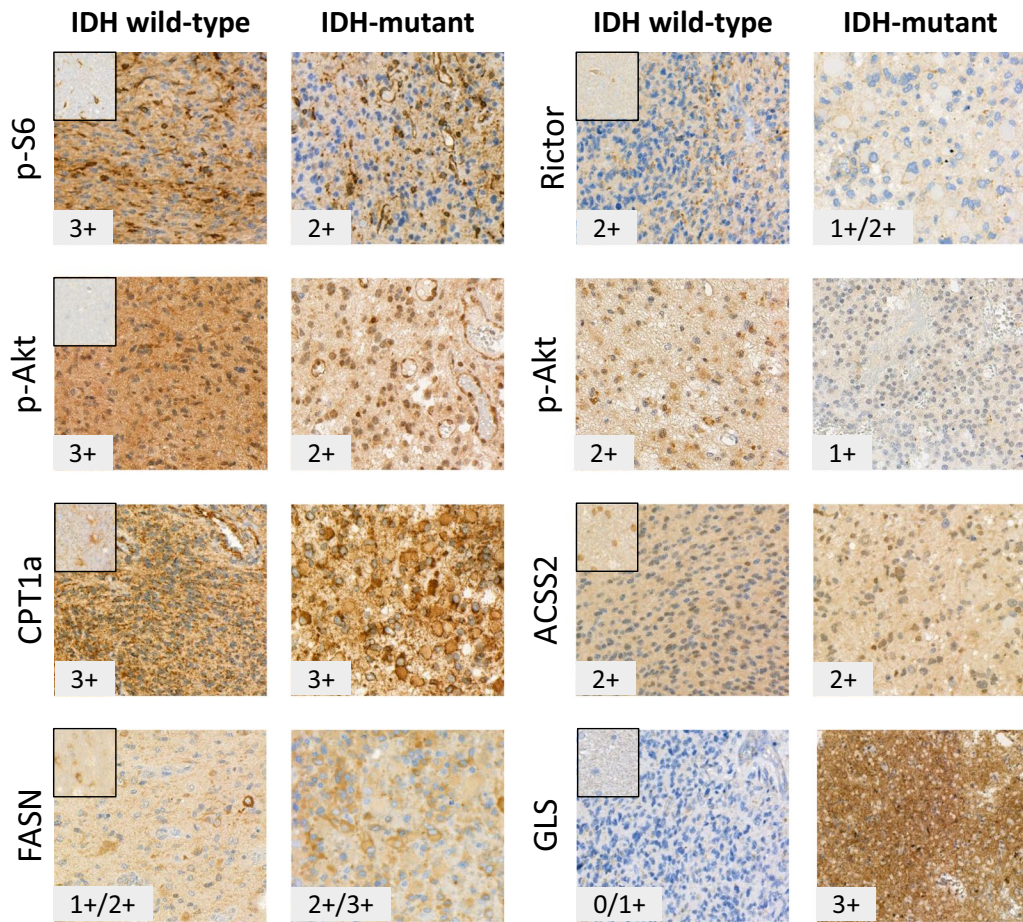


Fig. 7 Representative stainings for metabolic protein expression analyses in human glioma biopsies. Metabolic and mTOR pathway related protein expression patterns and evaluated staining scores were shown in representative human IDH wild-type and mutant gliomas. Stainings of normal brain tissues were added to the upper left corner. High mTOR activity—with tissue heterogeneity and characteristic CPT1a protein overexpression (17/18 3+ scores) were detected in almost all studied gliomas. The intra- and intertumoral heterogeneity appeared in e.g. p-S6, FASN and p-(Ser473)-Akt stainings, respectively. Significant differences between IDH wild-type and mutant cases were only observed in GLS expression scores, the IDH-mutant glioma tissues expressed higher amount of GLS protein (expression scores were 2/3+ in 6/8 mutant and 0/1+ in 8/10 studied IDH wild-type cases). Further explanation is in the text. Immunohistochemistry stainings of IDH wild-type (n = 10) and IDH-mutant (n = 8) cases were developed by DAB (brown) using haematoxylin counterstaining—the representative photos were taken by Panoramic Viewer (3D Histech—x 40)

e.g. PI3KCA, PTEN mutations which could suggest possible mTORI sensitivity of tumours and could not lower the recurrence. Therefore, more molecular pathology data are needed to find new therapeutic options and these are also needed prior to drug administration in patients. However, many further problems also occur: (a) the great capacity of tumour tissues for shifting their metabolic profile to adapt and survive the therapeutic conditions in the presence of diverse microenvironments [28] and (b) the insufficient cost-benefit in tolerance of therapeutic efficacy and side-effect toxicity in patients (many promising drugs, especially mTOR, glutaminolysis or glycolysis inhibitors have been failed in clinical trials recently).

After applying temozolomide or rapamycin monotherapies, we found that the studied cells could alter both their glycolytic/OXPHOS and lipid synthetic processes as the consequences of metabolic adaptation. We detected ACSS2 increase and FASN decrease; in parallel, with or without CPT1a expression changes dependent on the cell line examined. These alterations and other recently published data highlight the potential role of lipid and/or acetate utilisation as bioenergetic substrates in survival adaptation during therapy in glioma cells [29]. Our results about the individual differences in FASN and ACSS2 overexpression, and the overexpression of CPT1a in almost all clinical samples suggest the potential role of lipid metabolism in therapy resistance. These

and the increased ACSS2 expression after temozolomide or mTORI treatments in vitro correlate to other studies where inhibited glucose consumption triggered AMPK activation and autophagy related acetate consumption in glioma cells [30]. Etomoxir (an irreversible CPT1a inhibitor) can inhibit fatty acid oxidation. Its effect can slow down glioma tumour growth, which was described in mouse glioma models [20] and there are many other data suggesting that fatty acids are critical for GBM growth [28]. In our work, we observed some additional effects of etomoxir combinations, however, these were rather cell type dependent, and less pronounced when this drug was combined with rapamycin or temozolomide. Therefore, the potential importance of etomoxir or other fatty acid oxidation inhibitors need further studies and improvements.

Several successful results have been reported on using temozolomide + autophagy inhibitor combinations [16, 31]. Chloroquine targeting autophagy showed lower sensitivity in the studied cells and different two-drug combinations showed less anti-proliferative benefit with rapamycin, temozolomide or other used drugs. None of these combinations reached the effectivity of rapamycin + temozolomide treatments in the studied glioma cells in vitro. Moreover, combining chloroquine could also reduce the efficiency of two other combined drugs in U373-U cells (data not shown), but could induce the anti-proliferative effect of temozolomide + doxycycline in U87 and rapamycin + doxycycline in U373-U, respectively. These results call the attention to the controversial contribution of autophagy to the development and progression of cancers, and especially in in vivo trials which are more complex [32]. Although in in vivo situation with long-term treatments some unexpected results could also arise with autophagy inhibitors, beside their hopefully special benefits, which need further studies.

Before and after radiotherapy significant differences were described in metabolites, cells rapidly turn to OXPHOS inhibiting mTOR and HK2 in glioma cell line, as a model system [33]. In our work, we detected altered metabolite concentrations but these were the consequences of rather mTORI than temozolomide treatments specific effects. Metabolic enzyme expression changes could also be found after temozolomide treatments in the studied less temozolomide sensitive cell lines (proliferation was decreased by less than 20% after 72 h). Relating to the observed effects of temozolomide suggest some putative shifts towards more OXPHOS-like phenotype in these cells, which is in correlation to the findings of Oliva et al. [34, 35] in case of temozolomide chemoresistance targeted by complex I–IV inhibitors. This work highlighted that mitochondrial metabolism could be a therapeutic avenue for chemoresistance breakthrough.

In our work, we used doxycycline (known mitochondria targeting antibiotics) which was able to sensitise the studied glioma cells to temozolomide. Doxycycline has been tested recently both in vitro and in vivo glioma models, it was very effective in A172 astrocytoma cells [36]. Certain aspects of doxycycline treatment were described by Wang-Gillam et al. in 2007 [37], they detected mild anti-proliferative effect and MMP2 expression increase in high-dose doxycycline (10 µg/mL) in vitro treatment. It was suggested that doxycycline is a potential anti-migratory agent in TSC2 dysfunction (mutation) cases—but this combination was not further tested elsewhere [38]. The anti-tumoural properties of doxycycline and other antibiotics are intensively investigated by several groups to clear the effect of this drug on tumour stemness, as well [39]. According to our work, the synergistic anti-proliferative effects of doxycycline in combination with other drugs are suggested. We studied doxycycline + rapamycin treatment first in glioma cell proliferation and we found that doxycycline enhanced the anti-proliferative effect of rapamycin in all studied glioma cells.

These results suggest the importance of testing the effectivity and the other—such as pro-apoptotic or tissue environmental—effects of this combination further in vitro and in vivo in gliomas or other tumours (we have some promising results with other solid tumour cell lines, as well—data not shown). Additionally, rapalogs or antibiotics cause fewer side-effects for patients and can be combined with other tumour type specific reduced dose chemotherapeutic treatments.

The detected diversity in the metabolic changes of the studied glioma cell lines could not point out a clear correlation between the original metabolic phenotype and the subsequent expected metabolic alteration in response to certain treatments. To find such potential adaptation mechanisms related to original phenotype, tumour type and/or drug responses need further investigation. Based on our in vitro metabolic drug combination results, we can suggest using combined treatments against different metabolic pathways which will restrict the possibilities of adaptation and rescue mechanisms in many different tumour cells during the developing therapy resistance.

Based on our IHC results: (a) the expression of many metabolic enzymes showed intra- and intertumoural heterogeneity; (b) CPT1a expression is elevated in human glioma cases (our results confirm the potential importance of CPT1a expression in gliomas which was described in vitro by Wakamiya et al. [40]); and (c) GLS is overexpressed in IDH-mutant cases (the importance of glutamine metabolism was highlighted as special interest in glioma cases by others, as well [41]). These and the results of our in vitro metabolic drug combination

treatments suggest considering the use of more potential metabolic targets in glioma therapy and analysing these targets further using more clinical samples and survival data of patients. These could help to identify new markers beside mTOR activity characterisation—such as FASN, CPT1a, ACSS2—or find good mitochondrial function markers (e.g. TOM20, NRF1), and to assign the metabolic expression profile of tumours before starting treatments in patients. mTOR inhibitors alone or in combinations with traditional chemotherapeutics resulted mainly at below the expected breakthrough. The main causes could be the tissue heterogeneity, the metabolic plasticity and the generated alterations in treated cells. The dormant, resistant state can also correlate to phenotypic OXPHOS shifts and the mitochondrial functions. Our results could approve this possibility in glioma cells. In addition, we call the attention for new rapalog + doxycycline therapeutic combinations in the future with potentially fewer side-effects.

Targeting altered mitochondrial function to increase sensitivity was suggested previously to inhibit complex I in gliomas using other drugs like metformin or phenformin [42]. These drugs show promising anti-tumour effects in multiple cancers which were tested and confirmed in glioma in vitro and in vivo xenograft models [43]. Based on our data, doxycycline needs some more attention in GBM treatment because it has long and safe history; furthermore, it can also penetrate across the blood–brain barrier [44]. Additionally, doxycycline could be considered as a potential efficacious combining agent among the few available ones in GBM therapy, especially with rapamycin or other mTORI treatments. Moreover, rapamycin + doxycycline combination could have a special interest in the standard treatment of other therapy resistant tumours, as well.

Conclusion

Metabolic heterogeneity and plasticity attract the attention to tumour metabolism targeting as an anti-cancer therapy, however, tumour tissue is able to adapt more successfully to nutrient deprivation or other microenvironmental changes than (normal) cells in vitro. To predict these alterations further studies are needed in tumour metabolism which might lead to select prognostic and predictive markers. Nevertheless, certain already well-known agents combined with tumour metabolism targeting drugs could facilitate the success of recent tumour therapy. Based on these, there is a great hope that new or old metabolic inhibitors such as mTOR inhibitors and other metabolism targeting drugs will turn the recent therapy highly effective in patients, especially in gliomas.

Abbreviations

4EBP1: eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1; ACSL1: long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1; ACSS2: acyl-coenzyme A synthetase short-chain family member 2; AGC: protein kinase A, G, and C families; AKG: α -ketoglutarate; Akt: protein kinase B; AMPK: AMP-activated protein kinase; CDKN2A/B: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/B; CPT1a: carnitine palmitoyltransferase 1A; CST: Cell Signaling Technology; DAB: 3,3'-diaminobenzidine; DMSO: dimethyl sulfoxide; ECL: enhanced chemiluminescence; EGFR: epidermal growth factor receptor; FASN: fatty acid synthase; FBS: foetal bovine serum; FFPE: formalin-fixed, paraffin-embedded; GBM: glioblastoma multiforme; GLS: glutaminase; HK2: hexokinase 2; HRP: horseradish peroxidase; IDH: isocitrate dehydrogenase; IHC: immunohistochemistry; LC-MS: liquid chromatography-mass spectrometry; LDHA: lactate dehydrogenase A; LDHB: lactate dehydrogenase B; MMP2: matrix metalloproteinase-2; MRM: multiple reaction monitoring; MSH2: MutS protein homolog 2; mTOR: mammalian target of rapamycin; NF-1: neurofibromatosis 1; Notch-2: neurogenic locus notch homolog protein 2; NRF1: nuclear respiratory factor 1; OXPHOS: oxidative phosphorylation; PDGFRA: platelet-derived growth factor receptor α ; PDH: pyruvate dehydrogenase; PFKF: phosphofructokinase; PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase; PI3KCA: phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit A; PKC: protein kinase C; PTEN: phosphatase and tensin homolog; PVDF: polyvinylidene difluoride; S6K1: ribosomal protein S6 kinase beta-1; SGK: serum/glucocorticoid-regulated kinase; SRB: sulforhodamine B; SREBP1: sterol regulatory element-binding protein 1; TCA: tricarboxylic acid; TMA: tissue microarray; TOM20: translocase of outer membrane; TSC2: tuberous sclerosis complex 2; ULK1: Unc-51 like autophagy activating kinase 1; VEGF: vascular endothelial growth factor; β -F1-ATPase: β -F1-adenosine triphosphate synthase.

Authors' contributions

We declare that all authors have contributed significantly and all authors are in agreement with the content of the manuscript. Conception and design: AS; methodology: GP, ZH, IK, KM, RR, FT, TD; validation of data: AJ, KT-V, AS; analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, LC-MS and immunohistochemistry): GP, KM; ZH, IK, AJ, HR, AS; IDH mutation analyses: NN; experimental studies, administrative, technical support (i.e., experimental work or editing data presentation): GP, AS, ZH, IK, TD, RR, FT, EV; writing, review of the manuscript: GP, AS, TD, KT-V, ZH, IK; supervision and project administration: AS. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ 1st Department of Pathology and Experimental Cancer Research, Semmelweis University, Üllői út 26, Budapest 1085, Hungary. ² Hungarian Academy of Sciences-Momentum Hereditary Endocrine Tumours Research Group, Semmelweis University-National Bionics Program Budapest, Üllői út 26, Budapest 1085, Hungary. ³ Department of Biological Anthropology, Eötvös Loránd University, Pázmány Péter sétány 1/A, Budapest 1117, Hungary.

Acknowledgements

We would like to thank Attila Patócs for the accessibility of LC-MS equipment. We are grateful to Éva Mátrai Balogh, Zsuzsanna Kaminszky for their technical assistance in histological processing of human biopsies.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

The authors declare that the data supporting the findings of this study are available within the article.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

Human tissue samples were used with the approval of the Hungarian Scientific Council National Ethics Committee for Scientific Research (No. 7/2006).

Funding

Our research was supported by Bolyai Fellowship Program of the Hungarian Academy of Sciences, STIA (Scientific and Innovative Research Found of Semmelweis University—AS), FKIP (Higher Education Excellence Program at Semmelweis University—AS) and NKFI-FK-128404 (National Research,

Development and Innovation Office—AS), Hungarian National Talent and National Excellence Programs (ZH, IK and TD: supported by the ÚNKP-17-2/3 and ÚNKP-18-3 New National Excellence Program of the Ministry of Human Capacities) and EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 (GP); ZH's research work was supported by Richter Centenarium Foundation Fellowship-2016. Recent research works at 1st Department of Pathology and Experimental Cancer Research were founded by NVKP_16-1-2016-0004 grant of the Hungarian National Research, Development and Innovation Office (NKFIH) and by National Bionics Program of Hungary.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 13 September 2018 Accepted: 14 December 2018

Published online: 19 December 2018

References

- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016;131(6):803–20. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>.
- Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, Campos B, Nounshmeir H, Salama SR, Zheng S, Chakravarty D, Sanborn JZ, Berman SH, Beroukheim R, Bernard B, Wu CJ, Genovese G, Shmulevich I, Barnholtz-Sloan J, Zou L, Vegesna R, Shukla SA, Ciriello G, Yung WK, Zhang W, Sougnez C, Mikelsen T, Aldape K, Bigner DD, Van Meir EG, Prados M, Sloan A, Black KL, Eschbacher J, Finocchiaro G, Friedman W, Andrews DW, Guha A, Iacocca M, O'Neill BP, Foltz G, Myers J, Weisenberger DJ, Penny R, Kucherlapati R, Perou CM, Hayes DN, Gibbs R, Marra M, Mills GB, Lander E, Spellman P, Wilson R, Sander C, Weinstein J, Meyerson M, Gabriel S, Laird PW, Haussler D, Getz G, Chin L, TCGA Research Network. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*. 2013;155(2):462–77. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.034>.
- Babak S, Mason WP. mTOR inhibition in glioblastoma: requiem for a dream? *Neuro Oncol*. 2018;20(5):584–5. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nyo034>.
- Winkler F, Osswald M, Wick W. Anti-angiogenics: their role in the treatment of glioblastoma. *Oncol Res Treat*. 2018;41(4):181–6. <https://doi.org/10.1159/000488258>.
- Lin F, de Gooijer MC, Hanekamp D, Chandrasekaran G, Buil LC, Thota N, Sparidans RW, Beijnen JH, Würdinger T, van Tellingen O. PI3K-mTOR pathway inhibition exhibits efficacy against high-grade glioma in clinically relevant mouse models. *Clin Cancer Res*. 2017;23(5):1286–98. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1276>.
- Wahl M, Chang SM, Phillips JJ, Molinaro AM, Costello JF, Mazor T, Alexandrescu S, Lupo JM, Nelson SJ, Berger M, Prados M, Taylor JW, Butowski N, Clarke JL, Haas-Kogan D. Probing the phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin pathway in gliomas: a phase 2 study of everolimus for recurrent adult low-grade gliomas. *Cancer*. 2017;123(23):4631–9. <https://doi.org/10.1002/cncr.30909>.
- DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv*. 2016;2(5):e1600200. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600200>.
- Samanta D, Semenza GL. Metabolic adaptation of cancer and immune cells mediated by hypoxia-inducible factors. *Biochim Biophys Acta*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.07.002>.
- Schlaepfer IR, Rider L, Rodrigues LU, Gijón MA, Pac CT, Romero L, Cimic A, Sirintrapun SJ, Glodé LM, Eckel RH, Cramer SD. Lipid catabolism via CPT1 as a therapeutic target for prostate cancer. *Mol Cancer Ther*. 2014;13(10):2361–71. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0183>.
- Zhang K, Xu P, Sowers JL, Machuca DF, Mirfattah B, Herring J, Tang H, Chen Y, Tian B, Brasier AR, Sowers LC. Proteome analysis of hypoxic glioblastoma cells reveals sequential metabolic adaptation of one-carbon metabolic pathways. *Mol Cell Proteomics*. 2017;16(11):1906–21. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA117.000154>.
- Libby CJ, Tran AN, Scott SE, Griguer C, Hjelmeland AB. The pro-tumorigenic effects of metabolic alterations in glioblastoma including brain tumor initiating cells. *Biochim Biophys Acta*. 2018;1869(2):175–88. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.01.004>.
- Saxton RA, Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell*. 2017;169(2):361–71. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.035>.
- Guri Y, Colombi M, Dazert E, Hindupur SK, Roszik J, Moes S, Jenoe P, Heim MH, Riezman I, Riezman H, Hall MN. mTORC2 promotes tumorigenesis via lipid synthesis. *Cancer Cell*. 2017;32(6):807–823.e12. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.11.011>.
- Yu Z, Xie G, Zhou G, Cheng Y, Zhang G, Yao G, Chen Y, Li Y, Zhao G. NVP-BEZ235, a novel dual PI3K-mTOR inhibitor displays anti-glioma activity and reduces chemoresistance to temozolomide in human glioma cells. *Cancer Lett*. 2015;367(1):58–68. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.007>.
- Zhao HF, Wang J, Shao W, Wu CP, Chen ZP, To ST, Li WP. Recent advances in the use of PI3K inhibitors for glioblastoma multiforme: current preclinical and clinical development. *Mol Cancer*. 2017;16(1):100. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0670-3>.
- Sanford PCH, John SK, Hsin-Chien C, Hsin-Ell W, Yu-Shan W, Cheng-Chung H, Yi-Chun H, Mau-Shin C, Minesh PM, Kwan-Hwa C. Temozolomide, sirolimus and chloroquine is a new therapeutic combination that synergizes to disrupt lysosomal function and cholesterol homeostasis in GBM cells. *Oncotarget*. 2018;9:6883–96. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23855>.
- Sticz T, Molnár A, Dankó T, Hujber Z, Petővári G, Nagy N, Végső G, Kopper L, Sebestyén A. The effects of different mTOR inhibitors in EGFR inhibitor resistant colon carcinoma cells. *Pathol Oncol Res*. 2018. <https://doi.org/10.1007/s12253-018-0434-4>.
- Hujber Z, Petővári G, Szoboszlai N, Dankó T, Nagy N, Kriston C, Krencz I, Paku S, Ozohanics O, Drahos L, Jeney A, Sebestyén A. Rapamycin (mTORC1 inhibitor) reduces the production of lactate and 2-hydroxyglutarate oncometabolites in IDH1 mutant fibrosarcoma cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017;36(1):74. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0544-y>.
- Bo C, Hong-gang Z, Wei W, Wen-guang G, Dong Z, Peng W. Studies on antitumor activity spectrum of doxycycline. *J Solid Tumors*. 2016. <https://doi.org/10.5430/jst.v6n1p103>.
- Lin H, Patel S, Affleck VS, Wilson I, Turnbull DM, Joshi AR, Maxwell R, Stoll EA. Fatty acid oxidation is required for the respiration and proliferation of malignant glioma cells. *Neuro Oncol*. 2017;19(1):43–54. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now128>.
- Ryu CH, Yoon WS, Park KY, Kim SM, Lim JY, Woo JS, Jeong CH, Hou Y, Jeun SS. Valproic acid downregulates the expression of MGMT and sensitizes temozolomide-resistant glioma cells. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:987495. <https://doi.org/10.1155/2012/987495>.
- Kim EL, Wüstenberg R, RübSam A, Schmitz-Salue C, Warnecke G, Bucker EM, Pettkus N, Speidel D, Rohde V, Schulz-Schaeffer W, Deppert W, Giese A. Chloroquine activates the p53 pathway and induces apoptosis in human glioma cells. *Neuro Oncol*. 2010;12(4):389–400.
- Fouquier J, Guedj M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacol Res Perspec*. 2015;3(3):e00149. <https://doi.org/10.1002/prp2.149>.
- Szoboszlai N, Guo X, Ozohanics O, Oláh J, Gömöry Á, Mihucz VG, Jeney A, Vékey K. 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*. 2014;819:108–15. <https://doi.org/10.1016/j.jaca.2014.01.055>.
- Jeney A, Hujber Z, Szoboszlai N, Fullár A, Oláh J, Pap É, Márk Á, Kriston C, Kralovánszky J, Kovácsky I, Vékey K, Sebestyén A. Characterisation of bioenergetic pathways and related regulators by multiple assays in human tumour cells. *Cancer Cell Int*. 2016;16:4. <https://doi.org/10.1186/s12935-016-0281-x>.
- Touat M, Idbaih A, Sanson M, Ligon KL. Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights. *Ann Oncol*. 2017;28(7):1457–72. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx106>.
- Faes S, Santoro T, Demartines N, Dormond O. Evolving significance and future relevance of anti-angiogenic activity of mTOR inhibitors in cancer therapy. *Cancers (Basel)*. 2017. <https://doi.org/10.3390/cancers9110152>.
- Ramirez YP, Weatherbee JL, Wheelhouse RT, Ross AH. Glioblastoma multiforme therapy and mechanisms of resistance. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013;6(12):1475–506. <https://doi.org/10.3390/ph6121475>.
- Schug ZT, Peck B, Jones DT, Zhang Q, Grosskurth S, Alam IS, Goodwin LM, Smethurst E, Mason S, Blyth K, McGarry L, James D, Shanks E, Kalna G, Saunders RE, Jiang M, Howell M, Lassally F, Thin MZ, Spencer-Dene B,

- Stamp G, van den Broek NJ, Mackay G, Bulusu V, Kamphorst JJ, Tardito S, Strachan D, Harris AL, Aboagye EO, Critchlow SE, Wakelam MJ, Schulze A, Gottlieb E. Acetyl-CoA synthetase 2 promotes acetate utilization and maintains cancer cell growth under metabolic stress. *Cancer Cell*. 2015;27(1):57–71. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.12.002>.
30. Li X, Yu W, Qian X, Xia Y, Zheng Y, Lee JH, Li W, Lyu J, Rao G, Zhang X, Qian CN, Rozen SG, Jiang T, Lu Z. Nucleus-translocated ACS2 promotes gene transcription for lysosomal biogenesis and autophagy. *Mol Cell*. 2017;66(5):684–697.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.04.026>.
31. Yan Y, Xu Z, Dai S, Qian L, Sun L, Gong Z. Targeting autophagy to sensitive glioma to temozolomide treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2016;35:23. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0303-5>.
32. Henson E, Chen Y, Gibson S. EGFR family members' regulation of autophagy is at a crossroads of cell survival and death in cancer. *Cancers (Basel)*. 2017. <https://doi.org/10.3390/cancers9040027>.
33. Lu CL, Qin L, Liu HC, Candas D, Fan M, Li JJ. Tumor cells switch to mitochondrial oxidative phosphorylation under radiation via mTOR-mediated hexokinase II inhibition—a Warburg-reversing effect. *PLoS ONE*. 2015;10(3):e0121046. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121046>.
34. Oliva CR, Nozell SE, Diers A, McClugage SG, Sarkaria JN, Markert JM, Darley-Usmar VM, Bailey SM, Gillespie GY, Landar A, Griguer CE. Acquisition of temozolomide chemoresistance in gliomas leads to remodeling of mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem*. 2010;285(51):39759–67. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.147504>.
35. Oliva CR, Markert T, Ross LJ, White EL, Rasmussen L, Zhang W, Everts M, Moellering DR, Bailey SM, Suto MJ, Griguer CE. Identification of small molecule inhibitors of human cytochrome c oxidase that target chemoresistant glioma cells. *J Biol Chem*. 2016;291(46):24188–99.
36. Tan Q, Yan X, Song L, Yi H, Li P, Sun G, Yu D, Li L, Zeng Z, Guo Z. Induction of mitochondrial dysfunction and oxidative damage by antibiotic drug doxycycline enhances the responsiveness of glioblastoma to chemotherapy. *Med Sci Monit*. 2017;23:4117–25.
37. Wang-Gillam A, Siegel E, Mayes DA, Hutchins LF, Zhou Y. Anti-tumor effect of doxycycline on glioblastoma cells. *J Cancer Mol*. 2007;3(5):147–53.
38. Ng HY, Oliver BG, Burgess JK, Krymskaya VP, Black JL, Moir LM. Doxycycline reduces the migration of tuberous sclerosis complex-2 null cells—effects on RhoA-GTPase and focal adhesion kinase. *J Cell Mol Med*. 2015;19(11):2633–46. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12593>.
39. De Francesco EM, Bonuccelli G, Maggiolini M, Sotgia F, Lisanti MP. Vitamin C and doxycycline: a synthetic lethal combination therapy targeting metabolic flexibility in cancer stem cells (CSCs). *Oncotarget*. 2017;8(40):67269–86. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18428>.
40. Wakamiya T, Suzuki SO, Hamasaki H, Honda H, Mizoguchi M, Yoshimoto K, Iwaki T. Elevated expression of fatty acid synthase and nuclear localization of carnitine palmitoyltransferase 1C are common among human gliomas. *Neuropathology*. 2014;34(5):465–74. <https://doi.org/10.1111/neup.12132>.
41. Panosyan EH, Lasky JL, Lin HJ, Lai A, Hai Y, Guo X, Quinn M, Nelson SF, Cloughesy TF, Nghiemphu PL. Clinical aggressiveness of malignant gliomas is linked to augmented metabolism of amino acids. *J Neurooncol*. 2016;128(1):57–66. <https://doi.org/10.1007/s11060-016-2073-5>.
42. Sesen J, Dahan P, Scotland SJ, Saland E, Dang VT, Lemarié A, Tyler BM, Brem H, Toulas C, Cohen-Jonathan Moyal E, Sarry JE, Skuli N. Metformin inhibits growth of human glioblastoma cells and enhances therapeutic response. *PLoS ONE*. 2015;10(4):e0123721. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123721>.
43. Jiang W, Finniss S, Cazacu S, Xiang C, Brodie Z, Mikkelsen T, Poisson L, Shackelford DB, Brodie C. Repurposing phenformin for the targeting of glioma stem cells and the treatment of glioblastoma. *Oncotarget*. 2016;7(35):56456–70. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10919>.
44. Andersson H, Alestig K. The penetration of doxycycline into CSF. *Scand J Infect Dis Suppl*. 1976;9:17–9.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions





Inhibition of Metabolic Shift can Decrease Therapy Resistance in Human High-Grade Glioma Cells

Gábor Petővári¹ · Titanilla Dankó¹ · Ildikó Krencz¹ · Zoltán Hujber¹ · Hajnalka Rajnai¹ · Enikő Vetlényi¹ · Regina Raffay¹ · Judit Pápay¹ · András Jeney¹ · Anna Sebestyén¹

Received: 21 May 2019 / Accepted: 28 May 2019 / Published online: 11 June 2019
© The Author(s) 2019

Abstract

The high-grade brain malignancy, glioblastoma multiforme (GBM), is one of the most aggressive tumours in central nervous system. The developing resistance against recent therapies and the recurrence rate of GBMs are extremely high. In spite several new ongoing trials, GBM therapies could not significantly increase the survival rate of the patients as significantly. The presence of inter- and intra-tumoral heterogeneity of GBMs arise the problem to find both the pre-existing potential resistant clones and the cellular processes which promote the adaptation mechanisms such as multidrug resistance, stem cell-ness or metabolic alterations, etc. In our work, the in situ metabolic heterogeneity of high-grade human glioblastoma cases were analysed by immunohistochemistry using tissue-microarray. The potential importance of the detected metabolic heterogeneity was tested in three glioma cell lines (grade III-IV) using protein expression analyses (Western blot and WES Simple) and therapeutic drug (temozolomide), metabolic inhibitor treatments (including glutaminase inhibitor) to compare the effects of rapamycin (RAPA) and glutaminase inhibitor combinations in vitro (Alamar Blue and SRB tests). The importance of individual differences and metabolic alterations were observed in mono-therapeutic failures, especially the enhanced Rictor expressions after different mono-treatments in correlation to lower sensitivity (temozolomide, doxycycline, etomoxir, BPTES). RAPA combinations with other metabolic inhibitors were the best strategies except for RAPA+glutaminase inhibitor. These observations underline the importance of multi-targeting metabolic pathways. Finally, our data suggest that the detected metabolic heterogeneity (the high mTORC2 complex activity, enhanced expression of Rictor, p-Akt, p-S6, CPT1A, and LDHA enzymes in glioma cases) and the microenvironmental or treatment induced metabolic shift can be potential targets in combination therapy. Therefore, it should be considered to map tissue heterogeneity and alterations with several cellular metabolism markers in biopsy materials after applying recently available or new treatments.

Keywords Glioma · Metabolism · Metabolic shift · mTORC2 · Combination therapy

Introduction

The high-grade glial tumour, glioblastoma multiforme (GBM), is one of the most aggressive and invasive tumours in central nervous system. Overall median survival of patients is approximately 8 months after GBM is diagnosed. The current standard therapy is surgical resection followed by adjuvant radiotherapy and/or chemotherapy.

Many years ago, temozolomide (TMZ) was introduced. TMZ administration could increase the survival moderately (up to 1 year) in trials for recurrent GBM to improve patients' survival [1, 2]. The developing resistance against TMZ (nearly 100% in all available treatment combinations) and the recurrence rate of GBMs are extremely high. The combined therapies (radiochemotherapy or other targeted therapy combinations) have more success and can increase the survival time and rate. Applying novel combined therapies, 2-year survival can be achieved in 27% of the cases comparing to the effect of radiotherapy or TMZ treatment alone (10%). However, GBM is still an incurable disease [3, 4]. Several novel trials are ongoing including VEGF inhibitor alone or in combinations. Moreover, in case of certain immunotherapies, with limitations and strict requirements – i.e. the drugs have

✉ Anna Sebestyén
anna@korb1.sote.hu

¹ 1st Department of Pathology and Experimental Cancer Research, Semmelweis University, Üllői út 26, Budapest H-1085, Hungary

to be transported across the blood-brain barrier, phase III trials are about to start [5, 6]. Despite there have been large developments in targeted therapy research, the currently available therapies could not increase the survival rate of GBM patients as significantly as it is observed in other solid tumours [7].

Recent studies highlighted that tumoral heterogeneity and different adaptation mechanisms can promote tumour evolution in high-grade malignancies. The presence of inter- and intra-tumoral heterogeneity of GBMs was described using many techniques including genetic studies and radiological imaging approaches [8–10]. These and other (e.g. microenvironmental, metabolic) types of tumoral heterogeneity raise the problem of finding both the pre-existing potential resistant clones and the cellular processes which promote the adaptation mechanisms such as multidrug resistance, stem cell-ness or metabolic alterations, etc. [11].

To design effective (novel) therapies the characteristics of intra-tumoral heterogeneity and the adaptation mechanisms during resistance evolution and/or relapsed tumour development are needed to study in details [9]. Tumour cells have high adaptation capacity using many different strategies including metabolic shifts. In tumour tissues, cells with different characteristics are to find the way to fuel energy and macromolecule production, and additionally to develop a resistant state in which the survival and growth are assured even in highly toxic microenvironment [12]. As for this adaptation, the surviving and proliferating cells need to orchestrate the speed of TCA

cycle, oxidative phosphorylation (OXPHOS), pentose-phosphate pathway, amino-acid and lipid synthesis etc. The oncogenic, tumorigenic alterations influence certain processes including glycolysis, glutaminolysis, mitochondrial oxidative function, lipid metabolism and autophagy [13]. To satisfy these needs certain metabolic shifts can be proceeded at cellular level in tumour cells, e.g. alterations in the expression and the activity of several metabolic enzymes and proteins [14].

Cellular metabolism can be characterised by mapping the expression and activity of different TCA cycle, glycolytic enzymes, transporters and kinases (Fig. 1.).

An important pathway in metabolic plasticity is the mammalian target of rapamycin (mTOR) centred signalling regulatory network. mTOR hyperactivation is characteristic for several tumours even for GBMs [15]. However, its regulatory role depends on different complex formation and activity; these complexes differ in their core proteins, targets, functions (including metabolic functions) and inhibitor sensitivities. Phospho-mTOR (in both mTORC1 and C2 complex activity could correlate to the amount of p-mTOR), Raptor (a characteristic protein for mTORC1), Rictor (a characteristic protein for mTORC2) are the main markers for characterising the amount and activity of mTOR. Additionally, phospho-S6 and phospho-(Ser473)-Akt (the activated targets of mTORC1 and C2, respectively) could also be used to complete the study of mTOR complexes activity [16].

The growth regulatory role of mTOR is well-known; it has many metabolic effects – directly influencing the protein

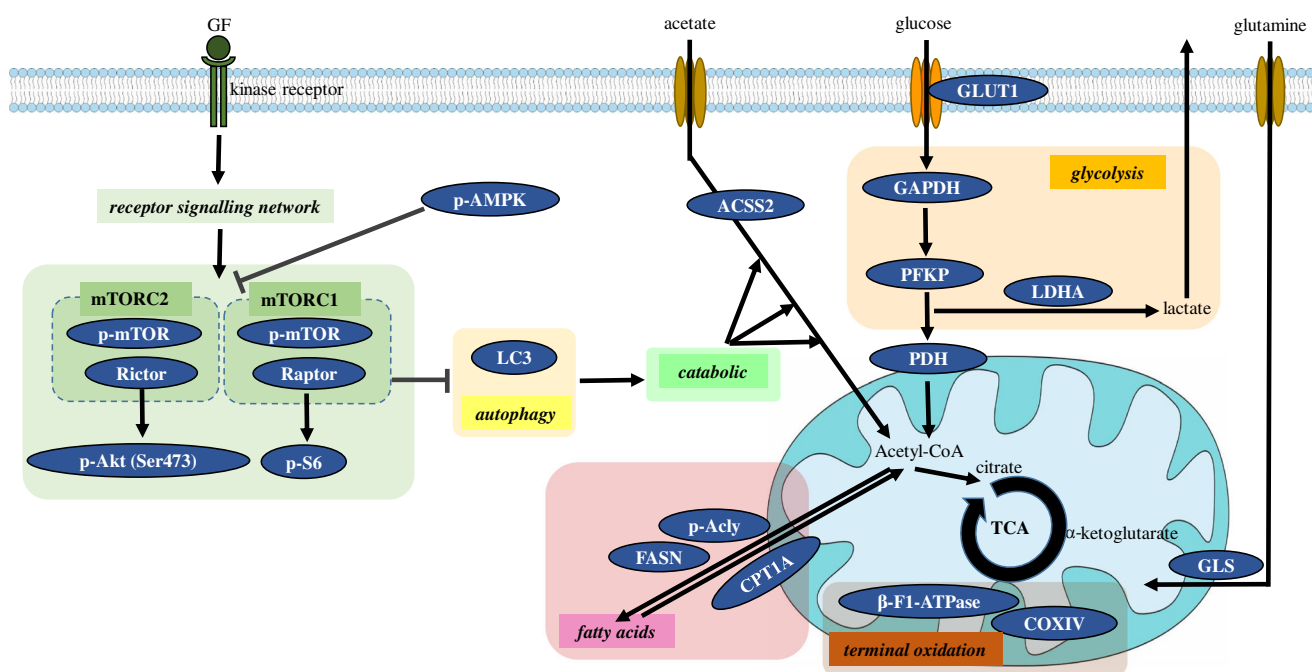


Fig. 1 Schematic figure of the studied metabolic pathways. The expressions of glutaminolysis (GLS), glycolysis (GLUT1, GAPDH, PFKP, LDHA, PDH), fatty acid metabolism (FASN, p-Acyl, CPT1A), acetate consumption (ACSS2), mitochondrial oxidative phosphorylation

(COXIV, β -F1-ATPase), autophagy (LC3), ATP sensor protein (p-AMPK) and mTOR complex activity (p-mTOR, Raptor, Rictor, p-S6, p-Akt (Ser473)) related enzymes were studied by Western blot analyses, WES Simple. Further explanation can be found in the text

synthesis, lipid metabolism and autophagy besides it indirectly influences many different genes (CPT1A – carnitine O-palmitoyltransferase 1, GLS - glutaminase, c-myc, etc.), which alter cellular metabolic activity [17].

Glycolytic activity, Warburg effect and mitochondrial metabolic functions can be monitored by the expression changes of e.g. glucose transporter 1 (GLUT1), phosphofructokinase (PFKP), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), pyruvate dehydrogenase (PDH), lactate dehydrogenase (LDH) and ATP synthase subunit beta (β -F1-ATPase), cytochrome c oxidase subunit 4 (COXIV) [13, 18]. Lipid synthesis, oxidation and their ratio can also be followed by studying the expression of fatty acid synthase (FASN), ATP-citrate synthase (p-Acly) and CPT1A [19]. Moreover, the bioenergetic states, the energy supply level can be characterised by phospho-AMP-activated kinase (p-AMPK), autophagy can be monitored by the expression of microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3) [20]. Glutamine and other possible alternative substrate consumption rate can be analysed by GLS, Acyl-coenzyme A synthetase short-chain family member 2 (ACSS2) levels [21], as well. The potential plasticity of substrate utilisation plasticity could also be interesting in brain tumours and brain metastases [14].

Many different compounds, including different TMZ combinations have been tested in glioma models in vitro and in vivo, however, the expected metabolic plasticity, the alterations in metabolic enzyme expression and activity have been less studied in high-grade gliomas. In our work, we analysed the in situ metabolic heterogeneity of high-grade (III-IV) isocitrate dehydrogenase (IDH) wild-type human glioblastoma cases using immunohistochemistry study. To understand the potential importance of the detected metabolic heterogeneity, we studied three IDH wild-type (grade III-IV) glioma cell lines further. TMZ, rapamycin (mTOR inhibitor) and several metabolic or other inhibitors (chloroquine, autophagy inhibitor; glutaminase inhibitor, etomoxir – lipid oxidation inhibitor, doxycycline – antibiotics with potential metabolic/mitochondrial inhibitory effect) were tested to analyse the alterations both in cellular proliferation and metabolic enzyme expression/activity after in vitro treatments. Finally, we studied the potential anti-proliferative effects of combined inhibitors in vitro for sensitising tumour cells to the used agents/treatments.

Materials and Methods

All Materials were Purchased from Merck-Sigma-Aldrich, except where it is Indicated in the Text

Human glioma cell lines – U373 Uppsala (U373-U; ECACC-08061901), U251 and U87 (ECACC-09063001, with PTEN, NF-1, p53 and MSH2 mutations; and ATCC-HTB-14,

characteristic mutations in PTEN, NF-1 and Notch-2, respectively) were maintained in DMEM high glucose medium (Biosera) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS; Biosera), 2 mM L-glutamine (Biosera) and 100 UI/ml penicillin–streptomycin (Biosera) at 37 °C with 5% CO₂. After seeding, the cells were treated with different drugs (rapamycin-RAPA, 50 ng/ml; doxycycline-DOXY, 10 μ M; temozolomide-TMZ, 100 μ M; etomoxir-ETO, 50 μ M; chloroquine-CHL, 50 μ M and bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-ethyl sulfide- BPTES, 10 μ M) and their combinations in 96-well plates ($2-5 \times 10^3$ cells/well for proliferation tests) or in T25 flasks ($3-6 \times 10^5$ cells/flask – for Western blot experiments) for 72 h. The concentration of the drugs was applied based on our previous publications [22]. Lower dose than IC₅₀ level was applied in drug combinations, these concentrations were defined in accordance with previously published data on IC₅₀ [23–26]. The anti-proliferative effects of the treatments were measured after a 4-h incubation period using Alamar Blue (Thermo Fisher Scientific). The fluorescence was measured at 570–590 nm (Fluoroskan Ascent FL fluorimeter; Labsystems International) and the results were analysed by Ascent Software. To detect the protein content related growth inhibitory effect, SRB test was performed as the following: after 10% trichloroacetic acid fixation, the cells were incubated with sulforhodamine B (15 min, 0.4 m/v%) then 10 mM Tris base was added to each well to solubilise the protein-bound dye. The absorbance was measured at 570 nm in a microplate reader. At least 3 independent experiments were performed with 6 parallels in each. Percentage of the cell proliferation was given relative to control samples. To analyse the additive or synergistic effects of different drug combinations the Combination Index (CI) was calculated as we described previously [22].

mTOR and Metabolic Protein Expression Analysis by Western Blot and WES Simple Capillary Immunoassay

Proteins were extracted (using 50 mM Tris, 10% glycerol, 150 mM NaCl, 1% Nonidet-P40, 10 mM NaF, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5 mM NaVO₃, pH 7.5) from 1×10^6 cells. The protein lysates were quantitated by Bradford reagent (BioRad). Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and PVDF membranes (BioRad) were used in Western blot analysis. The applied primary antibodies were listed in Table 1.; HRP-conjugated anti- β -actin (1:10000; ab49900, Abcam) was used as loading control. At the end, biotinylated secondary antibodies and avidin-HRP complex (Vectastain Elite ABC Kit, Vector), enhanced chemiluminescence technique (Pierce ECL Western Blotting Substrate) with Li-Cor-C-Digit photo documentation system were applied. Image Studio Digits program was used to perform densitometric analysis.

Table 1 List of the used primary antibodies (catalogue numbers, dilutions and expected sizes for Western blot analyses were given)

Primary antibody	IHC		Western blot		WES		size (kDa)
	Cat. No.	Dilution	Cat. No.	Dilution	Cat. No.	Dilution	
p-mTOR	CST #2976	1:100	CST #2971	1:1000	CST #2971	1:50	289
Rictor	Bethyl A500-002A	1:1000	CST #2140	1:1000	CST #2140	1:50	200
Raptor	–	–	Abcam 40,768	1:1000	Abcam 40,768	1:50	150
p-Akt (Ser473)	Novus 79,891	1:50	CST #4060	1:2000	CST #4060	1:50	60
p-S6	CST #2211	1:100	CST #4858	1:1000	CST #4858	1:50	32
ACSS2	–	–	–	–	CST #3658	1:50	78
FASN	CST #3180	1:50	–	–	CST #3180	1:50	273
p-Acyl	–	–	CST #4331	1:1000	CST #4331	1:50	125
CPT1A	Abcam 128,568	1:500	Abcam 128,568	1:1000	Abcam 12,8568	1:50	88
GLS	Abcam 156,876	1:200	Abcam 156,876	1:1000	Abcam 15,6876	1:50	65
GLUT1	–	–	Abcam 652	1:500	–	–	45–60
PFKP	–	–	CST #8164	1:1000	–	–	80
GAPDH	–	–	Abcam 8245	1:10000	Abcam 8245	1:50	37
PDH	–	–	CST #3205	1:1000	CST #3205	1:50	43
LDHA	CST #3582	1:400	CST #3582	1:1000	CST #3582	1:50	37
β -F1-ATPase	Abcam 14,730	1:100	Abcam 14,730	1:2000	–	–	52
COXIV	–	–	–	–	CST #4850	1:50	17
p-AMPK (Thr172)	–	–	CST #2535	1:1000	CST #2535	1:50	62
LC3	–	–	–	–	Novus 110–57179	1:50	14–16
β -actin	–	–	Abcam 49,900	10000	Sigma A2228	1:50	45

WES Simple analysis was performed on WES system (ProteinSimple-Biotechnique 004–600) according to the manufacturer's instructions. 12–230 kDa Separation Module (ProteinSimple SM-W004) and either the Anti-Rabbit Detection Module (ProteinSimple DM-001), Anti-Mouse Detection Module (ProteinSimple DM-002) or Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technologies, CST #7076) were applied depending on the primary antibodies. In brief, glioma cell samples were diluted to an appropriate concentration (0.2 or 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ depending on the secondary antibody used) in sample buffer (100x diluted '10x Sample Buffer' from the Separation Module), then mixed with Fluorescent Master Mix 1:4 and heated at 95 °C for 5 min. The samples, the blocking reagent (antibody diluent), the primary antibodies, the HRP-conjugated secondary antibodies and the chemiluminescent substrate were added to the plate. The default settings of the device were the following: stacking and separation at 395 V for 30 min; blocking reagent for 5 min, primary and secondary antibodies both for 30 min; luminol/peroxide chemiluminescence detection for 15 min (exposure times were selected for the antibodies between 1 and 512 s). The electropherograms were checked then the automatic peak detection was manually corrected if it was required. The used primary antibodies and their dilutions were given in Table 1.

Tissue Microarray from Human High-Grade Glioma Biopsies and Immunohistochemistry Analysis

Archived tissue blocks were used with the approval of The Hungarian Scientific Council National Ethics Committee for Scientific Research (No. 7/2006). IDH wild-type human glioblastoma and high-grade astrocytoma tissues ($n = 18$) were selected for immunohistochemistry analyses. Peri-tumoral brain tissue was used as control ($n = 2$). The glioma samples were re-reviewed and reclassified according to The World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System (2016) [27]. The clinicopathological data are summarised in Table 2.

Immunohistochemistry (IHC) was performed on tissue microarrays (TMAs) with at least duplicate or triplicate cores per patient. Representative areas were selected by a neuropathologist. Antigen retrieval (pH = 6 citric acid buffer, 30 min) was performed after deparaffinisation and endogenous peroxidase blocking. Slides were incubated with primary antibodies summarised in Table 1. Sections were stained using biotin-free anti-rabbit/mouse IgG polymer-peroxidase conjugate system (Novolink, Leica). Immunoreactions were revealed using a diaminobenzidine (DAB, Dako) chromogen-hydrogen peroxide substrate. Harris haematoxylin was applied for highlighting the cell nuclei. Immunostained TMA sections

Table 2 Clinicopathological data of patients with high-grade glioma

	n = 18
Age	
< 65 years	12
≥ 65 years	6
Sex	
Male	6
Female	12
Type	
Anaplastic astrocytoma (grade III)	4
Glioblastoma (grade IV)	14
Ki67 proliferation index	
< 20%	5
≥ 20%	13

were digitally scanned at 20X magnification using a Panoramic scan instrument (3D Histech) equipped with Carl Zeiss objective (NA = 0.83; Carl Zeiss MicroImaging Inc.) then analysed with CaseViewer 2.3 Software (3D Histech). Considering the intra-tumoral heterogeneity, the H-score was used to analyse the expression of mTOR and metabolism-related proteins. Based on our previously described method, H-score was calculated for each core of the TMA multiplying the fraction of tumour cell immunopositivity (%) and staining

intensity scale (0, 1+, 2+ or 3+) [28]. The mean of the H-scores for each sample was calculated from the evaluated cores of the same biopsy specimens using two independent evaluations.

Statistical Analysis

Data are presented as mean ± SD deviation. Statistical analysis was performed using IBM SPSS (version 22; SPSS Inc.) and PAST (version 3.24) software. Data evaluation of in vitro experiments was performed using Student’s t (two-tailed) test and one-way analysis of variance (ANOVA). Mann-Whitney U-test was used to determine associations between clinicopathological parameters and IHC results. Spearman correlation was used to evaluate the correlation between protein expressions. Statistical significance was defined as *p* < 0.05.

Results

Metabolic Heterogeneity of High-Grade Glioma Cases Based on Immunohistochemistry Analyses

Similarly, the p-mTOR expression observed in normal brain tissues with a mean H-score of 80, moderate p-mTOR staining with a mean H-score of 107 was detected in high-grade glioma

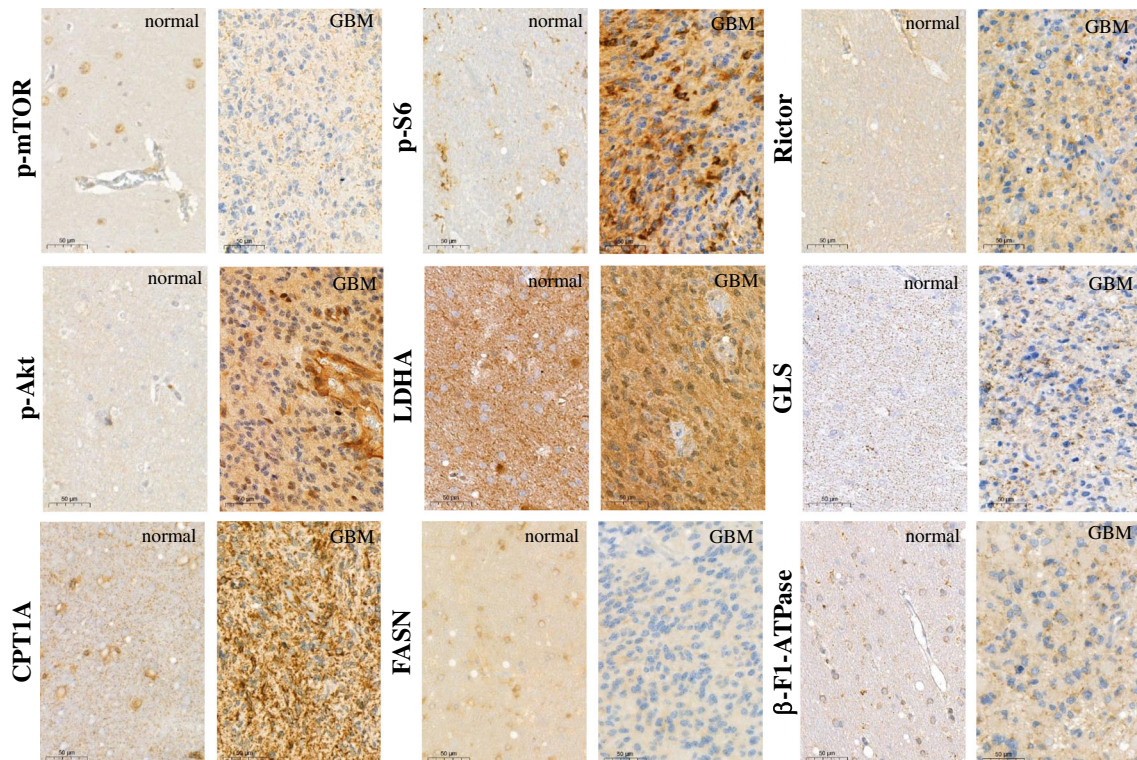


Fig. 2 Representative immunostainings with different metabolic markers in human high-grade gliomas and normal brain tissues. The antibody-stainings were developed with DAB substrate (brown) and

counterstained using haematoxylin. mTOR activity was characterised by p-mTOR, p-S6, Rictor, p-Akt stainings, other metabolic activity correlates to LDHA, GLS, CPT1A/FASN and β-F1-ATPase

samples in almost all cases (Fig. 2). In contrast, in many cases p-S6, Rictor and p-Akt protein expression patterns showed elevated mTOR, especially mTORC2 complex activities compared to normal brain tissues. The mean H-scores for p-S6, Rictor and p-Akt were 170, 128 and 190 in glioma samples and 70, 90, and 80 in normal brain tissue samples, respectively. The evaluation of other metabolic IHC stainings suggests that in the studied 18 cases high-grade glioma cells have characteristic elevated metabolic activity which correlates to a significant metabolic versatility in substrate utilisation. LDHA expression was elevated in normal brain tissues as well as in tumour samples. In addition, several substrate utilisation capacities can be observed in these glioma cells (e.g. GLS and CPT1A protein expression levels are higher in glioma cells). The lipid metabolism was shifted to catabolic β -oxidation pathway (CPT1A) from anabolic lipid synthesis (FASN). β -F1-ATPase, a marker of terminal oxidation, was also overexpressed in glioma tissues and showed a strong positive correlation to GLS expression ($R = 0.753$, $p = 0.001$) in glioma cells. Representative glioma and normal brain biopsy stainings show these differences (Fig. 2). Mainly, there was no association between the expression of the studied proteins and clinicopathological parameters such as age and gender. However, p-Akt expression was higher in grade IV glioblastomas than in grade III anaplastic astrocytomas. Moreover, higher FASN expression was associated with higher Ki67 proliferation index ($Ki67 < 20\%$ vs. $Ki67 \geq 20\%$, $p = 0.001$).

Metabolic Diversity of Human GBM Cell Lines

The characteristic mTOR inhibitor (mTORI) sensitivity of high-grade glioma cell lines has been studied previously. In our in vitro study, the proliferation could not be inhibited significantly by the common chemotherapeutic TMZ after 72-h treatment in two of the studied cell lines. However, we could confirm that the mTORC1 inhibitor RAPA significantly inhibited the proliferation of all high-grade glioma cell lines based on both Alamar Blue and SRB test results (Fig. 3). Our data are in good correlation to our other findings at protein level (using Western blot or WES Simple capillary immunoassay) in which we revealed that these cells have both mTORC1/C2 complex related high activity (detectable p-mTOR – activated form of mTOR kinase; high Rictor, p-Akt and p-S6 protein expressions) (Fig. 4). Other metabolic inhibitors have rather cell line dependent anti-proliferative effects: CHL – autophagy inhibitor could inhibit the proliferation in all studied cell lines, BPTES only in U87 and U251 cells and DOXY only in U251. Based on these, the most resistant cell line was U373-U (Fig. 3). To compare the differences, expressions of several other metabolic enzymes and proteins were studied. The protein expression profile of the three cell lines could also show some individual differences as a consequence of inter-tumoral heterogeneity. Some of these really interesting findings are the

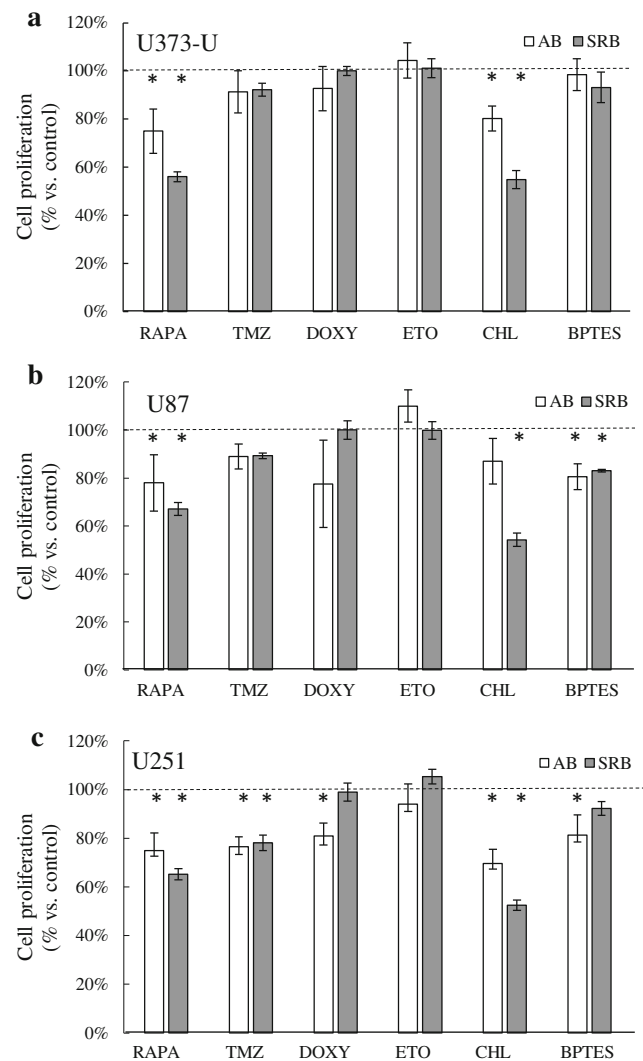
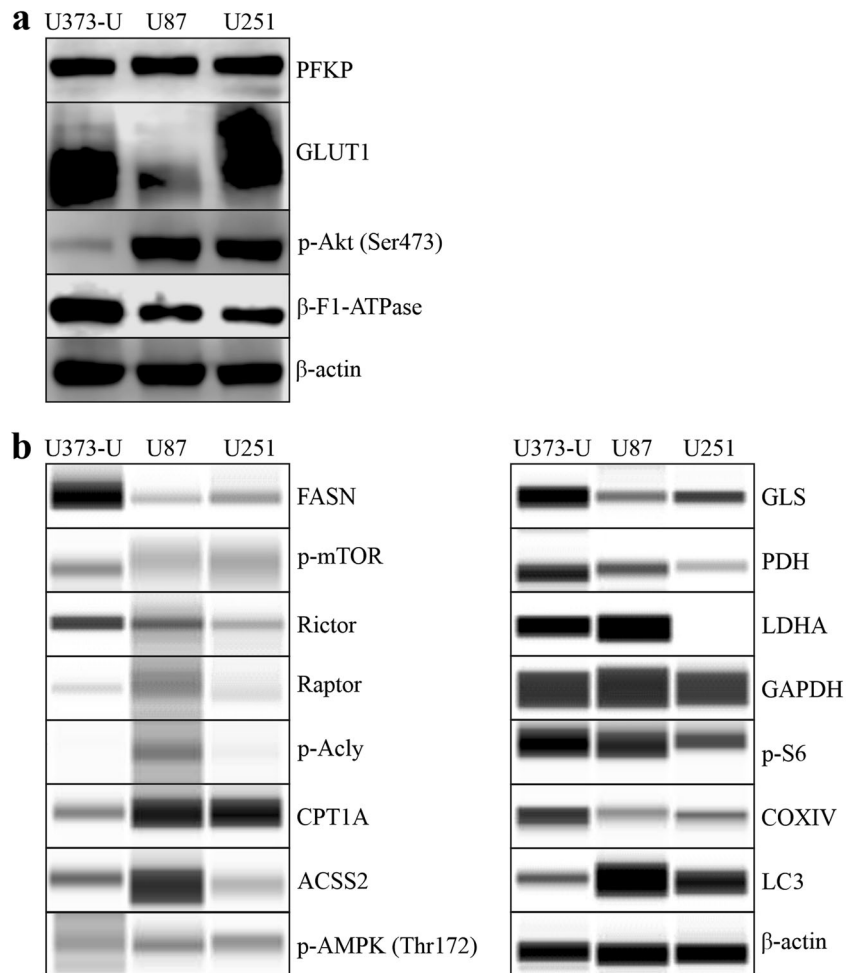


Fig. 3 Metabolic inhibitor and TMZ sensitivity differences in human high-grade glioma cells. The anti-proliferative effects of several metabolic treatments were shown using Alamar Blue (AB) and SRB tests (RAPA – rapamycin 50 ng/ml; TMZ – temozolomide 100 μ M; DOXY – doxycycline 10 μ M; ETO – etomoxir 50 μ M; CHL – chloroquine 50 μ M; BPTES – bis-2-(5-phenylacetoamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-ethyl sulfide 10 μ M were applied for 72 h) in U373-U (a), U87 (b) and U251 (c) cells. The significant alterations were labelled * ($p = 0.01$)

following: there is no detectable LDHA - the Warburg effect related enzyme - protein expression and the levels of β -F1-ATPase, COXIV and PDH were low in U251 and GLS expression was the lowest in U87 cells. The detected expression patterns (Fig. 4) could correlate to the sensitivity differences. Mainly, lower metabolic activity of a cell line (without glycolytic phenotype and lower mitochondrial activity) can correlate to higher inhibitor sensitivity. There are only few differences in the detected anti-proliferative alterations comparing the Alamar Blue and SRB test results, however, the SRB data were more strongly correlated to cell numbers. Based on these, we prefer using both tests in our further experiments.

Fig. 4 The metabolic activity related enzyme and protein expressions in human high-grade glioma cells. The metabolic profile differences were analysed in three high-grade glioma cell lines using Western blot (a) or WES Simple capillary immunoassay system (b) - the predicted protein sizes were shown in Table 1



Based on its highly resistant phenotype, U373-U cell line was selected for further analysis. To study the alterations of the metabolic enzyme expression quantitatively WES Simple capillary immunoassay and/or Western blot technique were applied. In this cell line, TMZ, DOXY, ETO and BPTES have no significant effect on the proliferation, however, RAPA and CHL have certain anti-proliferative effects (Fig. 3). In almost every single drug treatment performed on U373-U cells, the metabolic enzyme protein expression patterns (Western blot, WES Simple) were rewired. These alterations were mainly the expected ones. In case of TMZ, DOXY, ETO and BPTES treatments Rictor expressions were upregulated and some other potential compensatory mechanisms were activated (Fig. 5). For example, in TMZ treated cells both the mitochondrial (COXIV and β-F1-ATPase expressions) and the glycolytic (PFKP, PDH, LDHA) enzymes were intact; p-AMPK level, CPT1A expression and the related β-oxidation were upregulated in correlation to higher LC3 (activation of autophagy) and lower GLS expressions (no induced

glutamine utilisation) and lipid synthesis was blocked by the decreased Acly activation. U373-U cells could find alternative metabolic pathways and could proliferate at the same rate as control cultures in 72-h treatment period after TMZ. In addition, in RAPA or CHL treated cells many unpredictable and conflicting alterations could also occur. As an example, Rictor expressions were slightly downregulated and the sign of some mitochondrial compensatory mechanism could be observed in the analysed Alamar Blue and SRB results after RAPA treatments. However, neither glycolytic nor compensatory, other substrate utilisation pathways could be activated in these cells. GLS, PFKP were downregulated and the expression of other proteins related to potential lipid and autophagy derived compensatory mechanisms were rather conflicting. In the other anti-proliferative CHL treatment, we could not find real compensatory mechanism, glycolysis, glutaminolysis or mTOR could not be activated. This could be the sign of metabolic failure or catastrophe. In addition, to understand such a chaos further studies and biochemical functional analyses are needed.

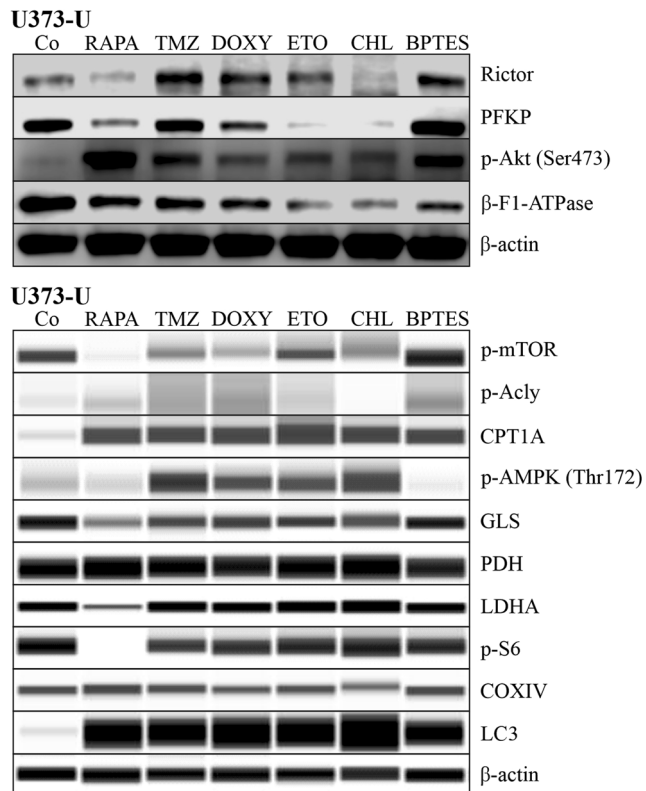


Fig. 5 Alteration in metabolic activity related enzyme and protein expressions. The signs of metabolic shifts were analysed after different drug treatments (RAPA – rapamycin 50 ng/ml; TMZ – temozolomide 100 μ M; DOXY – doxycycline 10 μ M; ETO – etomoxir 50 μ M; CHL – chloroquine 50 μ M; BPTES - bis-2-(5-phenylacetoamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-ethyl sulfide 10 μ M were applied for 72 h) in U373-U cell line by Western blot (upper image) or WES Simple capillary immunoblot system (lower image)–(the predicted protein sizes were shown in Table 1

The In Vitro Effect of Combining Metabolic Inhibitors in Glioma Cells

As we detected lower effects in high-grade glioma cell lines after in vitro mono-drug treatments, we applied certain combined treatments and compared their effects to RAPA+TMZ combination results using both Alamar Blue and SRB tests (Table 3.). However, our results draw attention to certain significant differences observed in the results of Alamar Blue and SRB tests; nevertheless these could only be interpreted in some combinations. The results of CHL combined treatments were the strangest in those cases. It is conceivable that the two inhibited metabolic pathways (including autophagy) try to activate mitochondrial compensatory mechanisms and alter (disturb) FADH + H⁺ concentrations. While ETO + CHL, BPTES+CHL and RAPA+CHL combinations seemed to be less effective according to Alamar Blue test results of U373-U cells. These combinations in correlation to their predictive effect (to block two alternate compensatory mechanisms) were really effective based on the protein content of the remaining cells. It was really surprising that BPTES+

Table 3 The anti-proliferative effects of combined treatments (Alamar Blue and SRB tests)

Combined treatments		AB	SRB
U373-U	RAPA + TMZ	76 ± 5.9%	S 44 ± 3.11% S
	RAPA + DOXY	66 ± 7.9%	S 48 ± 6.19% S
	RAPA + ETO	70 ± 4.6%	S 44 ± 6.25% S
	RAPA + CHL	78 ± 4.7%	– 28 ± 5.15% A
	BPTES + ETO	97 ± 10.4%	– 85 ± 4.18% S
	BPTES + CHL	80 ± 4.3%	A 44 ± 3.9% S
	BPTES + DOXY	83 ± 7.6%	S 94 ± 6.1% –
	DOXY + CHL	69 ± 2.4%	S 51 ± 1.29% S
	CHL + ETO	82 ± 3.8%	S 48 ± 6.5% S
	U87	RAPA + TMZ	65 ± 9.4%
RAPA + DOXY		56 ± 8.2%	S 55 ± 3.1% S
RAPA + ETO		65 ± 8.3%	– 56 ± 2% S
RAPA + CHL		52 ± 7.5%	S 38 ± 5.4% A
BPTES + ETO		79 ± 13.3%	S 86 ± 1.8% –
BPTES + CHL		55 ± 2.4%	S 45 ± 0.6% –
BPTES + DOXY		67 ± 11.1%	– 83 ± 1.6% –
DOXY + CHL		57 ± 3.5%	A 40 ± 0.4% S
CHL + ETO		82 ± 13.1%	– 48 ± 0.9% S
U251		RAPA + TMZ	65 ± 7.1%
	RAPA + DOXY	56 ± 9%	A 55 ± 2.5% S
	RAPA + ETO	65 ± 6.6%	A 56 ± 1.9% S
	RAPA + CHL	52 ± 4.7%	– 38 ± 1.9% A
	BPTES + ETO	79 ± 4.3%	– 86 ± 5.9% –
	BPTES + CHL	55 ± 4.2%	A 45 ± 2.4% A
	BPTES + DOXY	67 ± 4.6%	– 83 ± 3.8% –
	DOXY + CHL	54 ± 6.6%	– 48 ± 2.4% S
	CHL + ETO	65 ± 3.2%	– 47 ± 3.1% S

The detected proliferation rates were given relative to controls (%). The additive (A) or the synergistic (S) effects of different drug combinations (RAPA – rapamycin 50 ng/ml; TMZ – temozolomide 100 μ M; DOXY – doxycycline 10 μ M; ETO – etomoxir 50 μ M; CHL – chloroquine 50 μ M; BPTES – bis-2-(5-phenylacetoamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-ethyl sulfide 10 μ M) were calculated using the data sets of parallel monotherapies

ETO and BPTES+DOXY treatments were the less effective combinations in the studied three high-grade glioma cell lines. Moreover, the other tested combinations reduced the proliferation of these high-grade glioma cells to about 50% or lower. The RAPA+CHL combination was really effective in correlation to its altering function in cellular metabolism and regulation of the three glioma cell lines.

Discussion

The standard treatments surgery, radio- and chemotherapy – dominantly – have many limitations in GBM patients [29], the most important ones are the following: a. the special site of the

body – the blood-brain barrier filters many drugs; b. the tissue and genetic heterogeneity of the tumours; c. high resistance rate; and d. toxic side-effects (main targeted processes are also active in normal/non-malignant proliferating cells, as well). The high relapse rate is in good correlation to the first three points, moreover, quiescent tumour cells (e.g. cancer stem cells/dormant cells/glioma stem cells) may escape from the conventional therapies with many different strategies [30]. In 2011, Hanahan and Weinberg gave additional fundamental cancer hallmarks to explain these strategies and the complexity of tumorigenesis and tumour evolution. Nowadays, metabolic rewiring is an emerging hallmark in cancer research. The recently highlighted metabolic shifts support the rapid proliferation or the survival of highly resistant tumour cells in toxic microenvironment in order to facilitate energy production, macromolecule synthesis and maintenance of redox homeostasis [31].

It was clearly demonstrated in different studies that cancer bioenergetics is changed with dynamic alterations at metabolic level [13]. In our previous work, we tested TMZ with combined metabolic inhibitors, however, glutaminase inhibitors have not been studied [22]. It is well-known that beside glucose other important substrates can fuel bioenergetic mechanisms in mammalian cells. In the present study, we compared the effects of glutaminase inhibitor (BPTES) or RAPA combining with other metabolic inhibitors; including RAPA+TMZ treatment effectivity.

The connection between glutaminolysis and glycolysis, their dependence on cellular mTOR activity [32] were deeply investigated in many previous glioma studies [31, 33]. In addition, both mTOR complexes have been described to play an important role in the regulation of these processes. In our recent study, we could underline the importance of individual differences and metabolic alterations in therapeutic failures, especially the enhanced Rictor expressions after different treatments (TMZ, DOXY, ETO, BPTES). Based on these, mTORC2 driven metabolic shift in correlation to the detected AMPK and autophagy activation could suggest combining metabolic targets using dual mTOR inhibitors or combining the previous drugs with mTOR inhibitory treatments [31, 34, 35].

Our another interesting observation is the shift to mitochondrial oxidative phosphorylation after several mono- or combined treatments (e.g. in RAPA and CHL or RAPA+CHL, respectively) which can be assigned from the different results of Alamar Blue and SRB tests. This metabolic alteration towards OXPHOS can be targeted with different agents. This finding confirms that OXPHOS co-targeting could be another good option in the future as it has been suggested in Gboxin therapy or other antibiotics targeting mitochondrial functions (e.g. doxycycline) [36, 37].

According to our findings, the best combination strategies seemed to be the different RAPA combinations (TMZ/

DOXY/ETO/CHL), except for RAPA+BPTES, which underline the importance of multi-targeting metabolic pathways.

RAPA has more targets, it could inhibit glycolysis, glutaminolysis and several kinase activities related to other cellular mechanisms than BPTES – glutaminase inhibitor. RAPA plus one additional metabolic pathway targeting inhibitor could have more success than glutaminase inhibitor combinations if the side-effects will not increase in the patients.

Many publications have reported that using autophagy inhibitors in combination with targeted kinase inhibitors could have more success in gliomas, as well [38]. It was described that high-grade gliomas have high LC3 autophagy marker expression in tissue microenvironment, since gliomas use autophagy as a survival mechanism frequently [39]. Our results confirm that autophagy inhibitors could enhance the effect of many different anti-metabolic drugs. RAPA+CHL and RAPA+ETO were the most effective ones, these combinations had extremely high anti-proliferative effect, and these could even induce metabolic catastrophe in all high-grade glioma cells. In these cases, mTOR inhibitory effects were supplemented with blocking another alternative catabolic energy source related to autophagy/lipid oxidation. BPTES and DOXY could not have such a great effect in our 72-h treatments in concordance with the glutamine oxidation pathway – these two inhibitors involved in the same route in cellular metabolism and energy production [40].

Finally, our data suggest that the detected metabolic heterogeneity (the high mTORC2 complex activity, enhanced expression of Rictor, p-Akt, p-S6, CPT1A and LDHA enzymes in glioma cases) is a very promising combination target. This suggest studying the *in vivo* effect and the use of many different new or already known drugs with less potential side-effects in the future therapy of glioma models. However, further studies are needed to find the best combinations for patients. Therefore, it should be considered to map tissue heterogeneity and alterations with several cellular metabolism markers in biopsy materials after applying recently available or new treatments.

Acknowledgements We would like to thank Éva Mátrai Balogh for her technical assistance in histological elaboration of human biopsies.

Funding Open access funding provided by Semmelweis University (SE). Our research was supported by NKFI-FK-128404 (National Research, Development and Innovation Office - AS), MTA DSc Fellow (Hungarian Academy of Sciences - AS), FKIP (Higher Education Excellence Program at Semmelweis University - AS), Hungarian National Talent and National Excellence Programs (ÚNKP-18-3 New National Excellence Program of the Ministry of Human Capacities – IK) and EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 (GP). Recent research works at 1st Department of Pathology and Experimental Cancer Research were founded by National Bionics Program (Project no. ED_17-1-2017-0009) of from the National Research, Development and Innovation Fund Hungary and NVKP_16-1-2016-0004 grant of the Hungarian National Research, Development and Innovation Office (NKFIH).

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical Approval All procedures performed in this study were in accordance with the ethical standards of the Hungarian Scientific Council National Ethics Committee for Scientific Research (No. 7/2006) and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed Consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

- Abrams DA, Hanson JA, Brown JM, Hsu FP, Delashaw JB Jr, Bota DA (2015) Timing of surgery and bevacizumab therapy in neurosurgical patients with recurrent high grade glioma. *J Clin Neurosci* 22(1):35–39
- Omuro A, Chan TA, Abrey LE, Khasraw M, Reiner AS, Kaley TJ, Deangelis LM, Lassman AB, Nolan CP, Gavrilovic IT, Hormigo A, Salvant C, Heguy A, Kaufman A, Huse JT, Panageas KS, Hottinger AF, Mellinghoff I (2013) Phase II trial of continuous low-dose temozolomide for patients with recurrent malignant glioma. *Neuro-Oncology* 15(2):242–250. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nos295>
- Daniel P, Sabri S, Chaddad A, Meehan B, Jean-Claude B, Rak J, Abdulkarim BS (2019) Temozolomide induced Hypermutation in glioma: evolutionary mechanisms and therapeutic opportunities. *Front Oncol* 9:41. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00041>
- Wang J, Cazzato E, Ladewig E, Frattini V, Rosenbloom DI, Zairis S, Abate F, Liu Z, Elliott O, Shin YJ, Lee JK, Lee IH, Park WY, Eoli M, Blumberg AJ, Lasorella A, Nam DH, Finocchiaro G, Iavarone A, Rabadan R (2016) Clonal evolution of glioblastoma under therapy. *Nat Genet* 48:768–776. <https://doi.org/10.1038/ng.3590>
- Wu A, Maxwell R, Xia Y, Cardarelli P, Oyasu M, Belcaid Z, Kim E, Hung A, Luksik AS, Garzon-Muvdi T, Jackson CM, Mathios D, Theodros D, Cogswell J, Brem H, Pardoll DM, Lim M (2019) Combination anti-CXCR4 and anti-PD-1 immunotherapy provides survival benefit in glioblastoma through immune cell modulation of tumor microenvironment. *J Neuro-Oncol*. <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03172-5>
- Hodges TR, Ott M, Xiu J, Gatalica Z, Swensen J, Zhou S, Huse JT, de Groot J, Li S, Overwijk WW, Spetzler D, Heimberger AB (2017) Mutational burden, immune checkpoint expression, and mismatch repair in glioma: implications for immune checkpoint immunotherapy. *Neuro-Oncology* 19:1047–1057. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox026>
- Jain KK (2018) A critical overview of targeted therapies for glioblastoma. *Front Oncol*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00419>
- Hu LS, Ning S, Eschbacher JM, Baxter LC, Gaw N, Ranjbar S, Plasencia J, Dueck AC, Peng S, Smith KA, Nakaji P, Karis JP, Quarles CC, Wu T, Loftus JC, Jenkins RB, Sicotte H, Kollmeyer TM, O'Neill BP, Elmquist W, Hoxworth JM, Frakes D, Sarkaria J, Swanson KR, Tran NL, Li J, Mitchell JR (2017) Radiogenomics to characterize regional genetic heterogeneity in glioblastoma. *Neuro-Oncology* 19(1):128–137. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now135>
- Reinartz R, Wang S, Kebir S, Silver DJ, Wieland A, Zheng T, Küpper M, Rauschenbach L, Fimmers R, Shepherd TM, Trageser D, Till A, Schäfer N, Glas M, Hillmer AM, Cichon S, Smith AA, Pietsch T, Liu Y, Reynolds BA, Yachnis A, Pincus DW, Simon M, Brüstle O, Steindler DA, Scheffler B (2017) Functional subclone profiling for prediction of treatment-induced intratumor population shifts and discovery of rational drug combinations in human glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 15;23(2):562–574. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2089>
- Parker NR, Hudson AL, Khong P, Parkinson JF, Dwight T, Ikin RJ, Zhu Y, Cheng ZJ, Vafae F, Chen J, Wheeler HR, Howell VM (2016) Intratumoral heterogeneity identified at the epigenetic, genetic and transcriptional level in glioblastoma. *Sci Rep* 4(6):22477. <https://doi.org/10.1038/srep22477>
- Uribe D, Torres Á, Rocha JD, Niechi I, Oyarzún C, Sobrevia L, Martín RS, Quezada C (2017) Multidrug resistance in glioblastoma stem-like cells: role of the hypoxic microenvironment and adenosine signaling. *Mol Asp Med* 55:140–151. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.01.009>
- Roos A, Ding Z, Loftus JC, Tran NL (2017) Molecular and microenvironmental determinants of glioma stem-like cell survival and invasion. *Front Oncol* 7:120. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00120>
- Agnihotri S, Zadeh G (2016) Metabolic reprogramming in glioblastoma: the influence of cancer metabolism on epigenetics and unanswered questions. *Neuro-Oncology* 18(2):160–172. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov125>
- Libby CJ, Tran AN, Scott SE, Griguer C, Hjelmeland AB (2018) The pro-tumorigenic effects of metabolic alterations in glioblastoma including brain tumor initiating cells. *Biochim Biophys Acta* 1869(2):175–188. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.01.004>
- Jhanwar-Uniyal M, Wainwright JV, Mohan AL, Tobias ME, Murali R, Gandhi CD, Schmidt MH (2019) Diverse signaling mechanisms of mTOR complexes: mTORC1 and mTORC2 in forming a formidable relationship. *Adv Biol Regul* 72:51–62. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2019.03.003>
- Kim LC, Cook RS, Chen J (2017) mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment. *Oncogene* 36(16):2191–2201. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.363>
- Saxton RA, Sabatini DM (2017) mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell* 169(2):361–371. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.035>
- Guerra F, Arbin AA, Moro L (2017) Mitochondria and cancer chemoresistance. *Biochim Biophys Acta* 1858(8):686–699. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.01.012>
- Melone MAB, Valentino A, Margarucci S, Galderisi U, Giordano A, Peluso G (2018) The carnitine system and cancer metabolic plasticity. *Cell Death Dis* 9(2):228. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0313-7>
- Pezze PD, Ruf S, Sonntag AG, Langelaar-Makkinje M, Hall P, Heberle AM, Navas PR, van Eunen K, Tölle RC, Schwarz JJ, Wiese H, Warscheid B, Deitersen J, Stork B, Fäßler E, Schäuble S, Hahn U, Horvatovich P, Shanley DP, Thedieck K (2016) A systems study reveals concurrent activation of AMPK and mTOR by amino acids. *Nature Comm* volume 7, Article number: 13254
- Keenan MM, Chi JT (2015) Alternative fuels for cancer cells. *Cancer J* 21(2):49–55. <https://doi.org/10.1097/PPO.000000000000104>
- Petővári G, Hujber Z, Krencz I, Dankó T, Nagy N, Tóth F, Raffay R, Mészáros K, Rajnai H, Vetlényi E, Takács-Vellai K, Jeney A, Sebestyén A (2018) Targeting cellular metabolism using rapamycin and/or doxycycline enhances anti-tumour effects

- in human glioma cells. *Cancer Cell Int* 18:211. <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0710-0>
23. Bo C, Hong-gang Z, Wei W, Wen-guang G, Dong Z, Peng W (2016) Studies on antitumor activity spectrum of doxycycline. *J Solid Tumors*. <https://doi.org/10.5430/jst.v6n1p103>
 24. Lin H, Patel S, Affleck VS, Wilson I, Turnbull DM, Joshi AR, Maxwell R, Stoll EA (2017) Fatty acid oxidation is required for the respiration and proliferation of malignant glioma cells. *Neuro-Oncology* 19(1):43–54. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now128>
 25. Ryu CH, Yoon WS, Park KY, Kim SM, Lim JY, Woo JS, Jeong CH, Hou Y, Jeun SS (2012) Valproic acid downregulates the expression of MGMT and sensitizes temozolomide-resistant glioma cells. *J Biomed Biotechnol* 2012:987495. <https://doi.org/10.1155/2012/987495>
 26. Kim EL, Wüstenberg R, Rübsam A, Schmitz-Salue C, Warnecke G, Bücker EM, Pettkus N, Speidel D, Rohde V, Schulz-Schaeffer W, Deppert W, Giese A (2010) Chloroquine activates the p53 pathway and induces apoptosis in human glioma cells. *Neuro-Oncology* 12(4):389–400. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nop046>
 27. 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):803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
 28. Krencz I, Sebestyén A, Fábrián K, Márk Á, Moldvay J, Khor A, Kopper L, Pápay J (2016) Expression of mTORC1/2-related proteins in primary and brain metastatic lung adenocarcinoma. *Hum Pathol* 62:66–73. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2016.12.012>
 29. Masui K, Onizuka H, Cavenee WK, Mischel PS, Shibata N (2019) Metabolic reprogramming in the pathogenesis of glioma: update. *Neuropathology* 39(1):3–13. <https://doi.org/10.1111/neup.12535>
 30. Parada LF, Dirks PB, Wechsler-Reya RJ (2017) Brain tumor stem cells remain in play. *J Clin Oncol*. 20;35(21):2428–2431. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.73.9540>
 31. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 4;144(5):646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
 32. 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*. 2;36(1):74. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0544-y>
 33. Liu B, Huang ZB, Chen X, See YX, Chen ZK, Yao HK (2019) Mammalian target of rapamycin 2 (MTOR2) and C-MYC modulate glucosamine-6-phosphate synthesis in glioblastoma (GBM) cells through glutamine: Fructose-6-phosphate aminotransferase 1 (GFAT1). *Cell Mol Neurobiol* 39(3):415–434. <https://doi.org/10.1007/s10571-019-00659-7>
 34. Basho RK, Gilcrease M, Murthy RK, Helgason T, Karp DD, Meric-Bernstam F, Hess KR, Herbrich SM, Valero V, Albarracín C, Litton JK, Chavez-MacGregor M, Ibrahim NK, Murray JL, Koenig KB, Hong D, Subbiah V, Kurzrock R, Janku F, Moulder SL (2017) Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway for the treatment of mesenchymal triple-negative breast cancer: evidence from a phase I trial of mTOR inhibition in combination with liposomal doxorubicin and bevacizumab. *JAMA Oncol*. 1;3(4):509–515. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.5281>
 35. Stepanenko AA, Andreieva SV, Korets KV, Mykytenko DO, Baklaushev VP, Huleyuk NL, Kovalova OA, Kotsarenko KV, Chekhonin VP, Vassetzky YS, Avdieiev SS, Dmitrenko VV (2016) Temozolomide promotes genomic and phenotypic changes in glioblastoma cells. *Cancer Cell Int* 16:36. <https://doi.org/10.1186/s12935-016-0311-8>
 36. Shi Y, Lim SK, Liang Q, Iyer SV, Wang HY, Wang Z, Xie X, Sun D, Chen YJ, Tabar V, Gutin P, Williams N, De Brabander JK, Parada LF (2019) Gboxin is an oxidative phosphorylation inhibitor that targets glioblastoma. *Nature* 567(7748):341–346. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0993-x>
 37. Scatena C, Roncella M, Di Paolo A, Aretini P, Menicagli M, Fanelli G, Marini C, Mazzanti CM, Ghilli M, Sotgia F, Lisanti MP, Naccarato AG (2018) Doxycycline, an inhibitor of mitochondrial biogenesis, effectively reduces cancer stem cells (CSCs) in early breast cancer patients: a clinical pilot study. *Front Oncol* 12(8):452. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00452>
 38. Wang X, Qiu Y, Yu Q, Li H, Chen X, Li M, Long Y, Liu Y, Lu L, Tang J, Zhang Z, He Q (2017) Enhanced glioma therapy by synergistic inhibition of autophagy and tyrosine kinase activity. *Int J Pharm*. 30;536(1):1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.09.007>
 39. Padmakrishnan CJ, Easwer HV, Vijayakurup V, Menon GR, Nair S, Gopala S (2019) High LC3/Beclin expression correlates with poor survival in glioma: a definitive role for autophagy as evidenced by in vitro autophagic flux. *Pathol Oncol Res* 25:137. <https://doi.org/10.1007/s12253-017-0310-7>
 40. Scalise M, Pochini L, Galluccio M, Console L, Indiveri C (2017) Glutamine transport and mitochondrial metabolism in cancer cell growth. *Front Oncol* 11(7):306. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00306>
- Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

RESEARCH

Open Access



Rapamycin (mTORC1 inhibitor) reduces the production of lactate and 2-hydroxyglutarate oncometabolites in IDH1 mutant fibrosarcoma cells

Zoltán Hujber¹, Gábor Petővári¹, Norbert Szoboszlai², Titanilla Dankó¹, Noémi Nagy¹, Csilla Kriston¹, Ildikó Krencz¹, Sándor Paku^{1,3}, Olivér Ozohanics⁴, László Drahos⁴, András Jeney¹ and Anna Sebestyén^{1,3*}

Abstract

Background: Multiple studies concluded that oncometabolites (e.g. D-2-hydroxyglutarate (2-HG) related to mutant isocitrate dehydrogenase 1/2 (*IDH1/2*) and lactate) have tumour promoting potential. Regulatory mechanisms implicated in the maintenance of oncometabolite production have great interest. mTOR (mammalian target of rapamycin) orchestrates different pathways, influences cellular growth and metabolism. Considering hyperactivation of mTOR in several malignancies, the question has been addressed whether mTOR operates through controlling of oncometabolite accumulation in metabolic reprogramming.

Methods: HT-1080 cells – carrying originally endogenous *IDH1* mutation – were used in vitro and in vivo. Anti-tumour effects of rapamycin were studied using different assays. The main sources and productions of the oncometabolites (2-HG and lactate) were analysed by ¹³C-labeled substrates. Alterations at protein and metabolite levels were followed by Western blot, flow cytometry, immunohistochemistry and liquid chromatography mass spectrometry using rapamycin, PP242 and different glutaminase inhibitors, as well.

Results: Rapamycin (mTORC1 inhibitor) inhibited proliferation, migration and altered the metabolic activity of *IDH1* mutant HT-1080 cells. Rapamycin reduced the level of 2-HG sourced mainly from glutamine and glucose derived lactate which correlated to the decreased incorporation of ¹³C atoms from ¹³C-substrates. Additionally, decreased expressions of lactate dehydrogenase A and glutaminase were also observed both in vitro and in vivo.

Conclusions: Considering the role of lactate and 2-HG in regulatory network and in metabolic symbiosis it could be assumed that mTOR inhibitors have additional effects besides their anti-proliferative effects in tumours with glycolytic phenotype, especially in case of *IDH1* mutation (e.g. acute myeloid leukemias, gliomas, chondrosarcomas). Based on our new results, we suggest targeting mTOR activity depending on the metabolic and besides molecular genetic phenotype of tumours to increase the success of therapies.

Keywords: Rapamycin, mTOR, Oncometabolite, 2-hydroxyglutarate, Lactate, Tumour metabolism

* Correspondence: anna@korb1.sote.hu; hsebanna@gmail.com

¹1st Department of Pathology and Experimental Cancer Research, Semmelweis University, Üllői út 26, Budapest 1085, Hungary

³Tumor Progression Research Group of Joint Research Organization of Hungarian Academy of Sciences and Semmelweis University, Budapest, Hungary

Full list of author information is available at the end of the article



Background

Mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase represents an important regulator of cellular metabolism besides of its effects on cellular growth, protein synthesis, proliferation and survival. mTOR senses energy supply, nutrients, growth factors and other conditions in tumour microenvironment (e.g. oxygen, stress) at the crossroad of cellular signalling networks [1–3]. Available energy and nutrients besides appropriate growth factors allow mTOR activity which supports anabolic pathways, however, the absence of the above mentioned factors leads to the inactivation of mTOR and inhibits the anabolism and induces the cellular catabolism, such as autophagy. mTOR complexes orchestrate different pathways and based on their input influence cellular growth and metabolic programs. mTOR kinase exists in two structurally and functionally different protein complexes: rapamycin sensitive mTORC1 and rapamycin-resistant mTORC2 (however, mTORC2 could be rapamycin sensitive during a long-term treatment) [4, 5]. The multiple regulatory functions of mTOR complexes are achieved through different downstream targets. Translation, ribosome and mitochondrial biogenesis, autophagy, lipid biosynthesis are controlled by mTORC1, which phosphorylates e.g. p70S6K and 4-EBP1 and consequently other targets such as S6 which is a well-known marker of mTORC1 activity at protein level. mTORC2 phosphorylates e.g. Akt (at S473), SGK1 and PKC α and enhances survival and cytoskeletal reorganization [3]. Data about other functions of mTORC2 are emerging e.g. a potential metabolic regulatory role of mTORC2 is also in the centre of interest in recent studies.

The failures in PI3K/Akt/mTOR signalling pathway and hyperactivated mTOR kinase have been described in many tumours. In fact, a correlation between elevated mTOR activity – especially with potential high mTORC2 activity (mTORC2 complex related Rictor overexpression) – and poor clinical prognosis of different malignancies has been previously described in our and other studies [6–8]. Rapamycin (mTORC1 inhibitor) and its analogues (rapalogs; e.g. temsirolimus, everolimus) have been approved by FDA (Food and Drug Administration) and EMA (European Medicines Agency) in certain lymphomas, renal cell carcinomas, pancreatic and breast cancers; rapalogs and newly developing inhibitor phase studies are ongoing in many other malignancies.

The regulatory role of mTOR activity in the metabolic reprogramming has been highlighted in recent years. mTORC1 complex activity is necessary for appropriate glycolysis, glutamine consumption, pentose-phosphate pathway, lipid and nucleotide synthesis; moreover, it downregulates autophagy [9–11]. Through regulating these mechanisms, mTOR activity can help the adaptation

to altered energy-, nutrient supplies and microenvironment in metabolic reprogramming [12–14].

Lactate production is a result of Warburg effect in different tumours [10, 15]. Lactate can be regarded as an oncometabolite – oncometabolites are defined as small-molecule components of normal metabolism of which accumulation causes signalling dysregulation to establish a milieu that initiates carcinogenesis – based on emerging data. Lactate contributes to many effects which help the survival and clonal evolution of resistant tumour cells in tissue microenvironment [16–18]. The tumour microenvironment is a complex network of extracellular matrix molecules, soluble factors, non-tumorous cells, including stromal (e.g. cancer associated fibroblasts and endothelial cells, adipocytes) and immunoregulatory cells. Among the soluble factors present in the microenvironment, lactate production has particular importance through its effects not only in cancer, but also, in neighbouring cells. In vivo lactic acid contributes to acidosis, which – besides triggering pain in cancer patients – has more important signals for tumour angiogenesis and tumour immunosuppression, as well [19]. In addition, the decreasing pH may contribute to the metastasis formation (e.g. through MMP activation, matrix remodelling) of some cancers [19].

Moreover, tumour and stromal cells can utilize lactate for energy production depending on the oxygen concentration in metabolic symbiosis, as well [20, 21]. Certain dysfunctioning metabolic enzymes – e.g. mutated FH, SDH or IDH (mitochondrial IDH2 or cytoplasmic IDH1) – promote the accumulation of other oncometabolites such as fumarate, succinate and D-2-hydroxyglutarate [17, 22]. 2-hydroxyglutarate could exist as L- or D-enantiomers. Low level of L-2-HG could be produced independently from mutant IDH activity in certain cells at hypoxic conditions (e.g. malate dehydrogenase). However, D-2-HG (2-HG) is generated from α -KG by the mIDH and the level of this oncometabolite is highly elevated in mIDH bearing malignant cells [23].

The role of different oncometabolites is intensively studied in many tumourigenic events (pseudohypoxia, DNA methylation, histone modification etc.) and bioenergetics of tumour cells. Moreover, the expected regulatory role of 2-HG was also concluded in reprogramming of normal stromal cells, which could have tumour promoting effects on the microenvironment, as well [24]. *IDH1* mutations are described in 80% of gliomas, 20% of acute myeloid leukemias (AMLs) and in certain cholangiocarcinomas, thyroid cancers and chondrosarcomas [23, 25]. There are no data available about the role of mTOR activity in 2-HG production in any homozygous or heterozygous IDH mutant cells. Considering the aberrant regulatory impact of mTOR in malignant cells the question has been addressed whether

mTORC1 operates through controlling of oncometabolite accumulation in metabolic reprogramming.

In the present work, a heterozygous *IDH1* mutant cell line and its rapamycin sensitivity were studied in vitro and in vivo. Our new results proved the role of mTOR activity and the inhibitory effect of rapamycin both in lactate and in 2-HG oncometabolite productions of heterozygous *IDH1* mutant fibrosarcoma cells.

Methods

All materials were purchased from Sigma-Aldrich, except where it is indicated in the text.

In vitro cell cultures and different treatments

HT-1080 endogenous heterozygous *IDH1* mutant cell line was used for both in vitro and in vivo experiments. HT-1080 (CCL121-ATCC); KMH2, DEV (human Hodgkin lymphoma cells purchased from DSMZ), ZR-75.1 (CRL-1500-ATCC), U251 MG homozygous *IDH1*-R132H mutant (kindly provided by prof. W. Leenders) [26] cells were cultured in RPMI 1640 (R8758) or DMEM high glucose (Biosera, LM-D1108) (for U251 MG) medium supplemented with 10% (20% for DEV) fetal bovine serum (Hyclone) and gentamycin (for U251 MG penicillin-streptomycin). For different measurements, we plated the cells into T25 or T75 flasks (for Western blot, LC-MS and ¹³C-labelling experiments) or onto 6-, 96-well plates (for flow cytometry and Alamar Blue proliferation tests) using appropriate cell numbers ($3-8 \times 10^5$ cells/flask or $2-50 \times 10^3$ cells/well). Cells were treated with rapamycin (0.01–200 ng/mL), PP242 (1 μM, Tocris), BPTES (10 μM), Zaprinas (1–100–300 μM), sodium-L-lactate (5 mM), sodium D-2-hydroxyglutarate (0.5 mM) for 24–72 h. In ¹³C-labelling metabolic experiments, the plated cultures were washed (with DMEM D5030 – glucose-, glutamine- and pyruvate-free medium) and the medium was replaced by DMEM D5030 medium during labelling.

For ¹³C-labelling cells were incubated with 10 mM U-¹³C-glucose or 4 mM U-¹³C-glutamine or 10 mM 2-¹³C-acetate (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA) in D5030 medium for one hour before the extraction.

Cell proliferation, apoptosis and migration assays

To analyse the proliferation capacity Alamar Blue test was used (Thermo Fisher Scientific) – the incubation period was 4 h. Fluorescence was measured by Fluoroscan Ascent FL fluorimeter software (Labsystems International). Percentage of proliferation was given relative to control samples.

Apoptosis and cell cycle were measured by SubG1 analysis as described by Nagy et al. [27]; 10^6 cells were fixed in ice-cold ethanol (70%), followed by alkaline

extraction (200 mM Na₂HPO₂, pH 7.4), then stained with propidium-iodide. The measurements were carried out with FACSCalibur (BD Biosciences) and analysed by Kaluza software (Beckman Coulter).

Vertical migration from monolayer into extracellular matrix (ECM; MAXGel ECM) gel was studied using untreated and rapamycin treated (48 h, 50 ng/mL) HT-1080 cells (5×10^4) in six-well micro-plates and then ECM was overlaid and the tumour cells were allowed to migrate into the gel in the next 24 h. At the end of the incubation period the ECM gel was removed from the monolayer, the cells were released from both compartments and were counted in hemocytometer. The migratory capacity was given in the percentage of the cells which migrated into the matrix after rapamycin treatment related to the controls [28].

Expression analysis of different proteins by Western blot and flow cytometry

For Western blot analysis protein extracts from lysated cells were quantitated using Quant-iT protein assay (Invitrogen) and were separated by SDS-PAGE. Proteins were transferred to PVDF membrane applying semidry technique (BioRad), membranes were incubated with the following antibodies: anti-phospho-mTOR (Ser2448, 1:1000, #2971; Cell Signaling Technologies – CST), anti-phospho-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-lactate dehydrogenase A (LDH-A) (1:1000; #3582, Cell Signaling), anti-glutaminase (Gls) (1:1000; #15676, Abcam) and anti-β-actin (1:5000; #A228, Sigma-Aldrich) as loading control. Finally, biotinylated secondary antibodies, avidin-HRP complex (Vectastain Elite ABC Kit, Vector) and enhanced chemiluminescence technique (Pierce ECL Western Blotting Substrate using Kodak-Xmat) were used.

For flow cytometric measurements 10^6 cells were fixed and permeabilized using IntraStain Kit (DAKO), then were stained with the appropriate primary antibodies anti-LDH-A (1:200; #3582, Cell Signaling), anti-Gls (1:250; #15676, Abcam) after different treatments. LDH-A and Gls expressions were detected with secondary anti-rabbit IgG Alexa-Fluor 647 antibody (Invitrogen). Samples were measured by Navios flow cytometer (Beckman Coulter) and analysed by Kaluza software (Beckman Coulter). Displayed results are mean fluorescence intensities (MFI).

Confirmation of IDH mutation by Sanger sequencing

Both *IDH1* and *IDH2* genes were analysed after using routine DNA Isolation kit for Cells and Tissue (Roche), specific amplifications (AmpliQGold Master Mix with the appropriate primers - *IDH1* exon4 forward:

aaaacttgctcttaattttctctt; reverse: acatacaagttggaatttcttg; *IDH2* exon4 forward: tctagactctactgccttctc; reverse: gtca gtggatcccctctcca – AppliedBiosystems), purification (ExoSAP-IT – Affimetrix) and direct sequencing (25 cycles at 51 °C, BigDye 3 Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit in Genetic Analyser 3500 - Applied BioSystem).

Metabolite analysis using liquid chromatography mass spectrometry

Intracellular metabolites (lactate, citrate, malate, succinate, 2-HG) were extracted by a modified method based on Szoboszlai et al. [29]. In brief, the cells were quenched in liquid nitrogen and extracted by mixture of MeOH–chloroform–H₂O (9:1:1) and vortexed at 4 °C. After centrifugation (15,000xg, 10 min, 4 °C) the clear supernatants were kept at –80 °C. The samples were prepared for LC-MS by the established derivatization based on the protocol of Jaitz et al. [30]. For derivatization 3-nitrobenzyl-alcohol + trimethyl-chlorosilane were added to the dried samples, sonicated and incubated at 80 °C for 45 min. The reaction was stopped by 100 mM ammonium-hydrogencarbonate solution. After these processes the samples were diluted in acetonitrile-water solution. Gradient elution was used with reversed-phase chromatography in Waters Acquity LC system. The detection was performed by Waters Micromass Quattro Micro triple quadrupole mass spectrometer (Waters Corporation, Milford MA, USA) using electrospray source in the positive ion mode with single ion monitoring mode. Standards (L-lactic acid, L-malic acid, succinic acid, citric acid, D-2-hydroxyglutarate) and other chemicals except for labelled substrates were purchased from Sigma-Aldrich for these measurements. The analytes were detected in multiple reaction monitoring mode in MS. HT-1080 cells produce only D-2-HG [31]. Applying this method, we did not distinguish L- and D- 2-HG enantiomers and we use 2-HG, as a synonym for D-2-HG in the manuscript.

For ¹³C-labelling, cells were incubated with 10 mM U-¹³C-glucose or 4 mM U-¹³C- glutamine or 10 mM 2-¹³C-acetate (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA) in D5030 medium for one hour before the extraction.

In vivo studies with HT-1080 xenograft model

Xenograft tumours were established in SCID mice by injecting 2 × 10⁶ HT-1080 cells subcutaneously (s.c.) into the sole region of 8–10-week-old (20–23 g) mice. Palpable tumours were removed and cut into equal pieces then were transplanted into secondary recipient mice. When palpable s.c. tumours developed, animals were divided into control and rapamycin-treated groups (*n* = 10 each). Rapamycin (Rapamune 1 mg/mL, Wyeth Europa Ltd.) was administered by gavage at 3 mg/kg

body weight three times per week for 3 weeks. Control groups were treated with saline. Body weight and tumour size were determined. Tumour volume was calculated as follows: $\pi/6 \times (2 \times \text{shorter diameter} + \text{longer diameter})^3$. Tumour weights were measured in euthanized animals at the end of the experiments. Tumour tissues were formalin-fixed and paraffin-embedded. Immunostaining was performed by anti-p-S6 (1:100; #2211; CST), anti-p-mTOR (1:100; 2971, CST), anti-Gls (1:200, #15676, Abcam) and anti-LDH-A (1:400; #3582, CST) antibodies according to Krencz et al [32]. Frozen tumour samples were also preserved at -80 °C for LC-MS metabolite extraction. In vivo experiments were approved by the Institutional Ethical Review Board (PEI/001/2457-6/2015) and the Institutional Animal Care Laboratory, with official permissions (PEI/001/1733-2/2015).

Statistical analysis

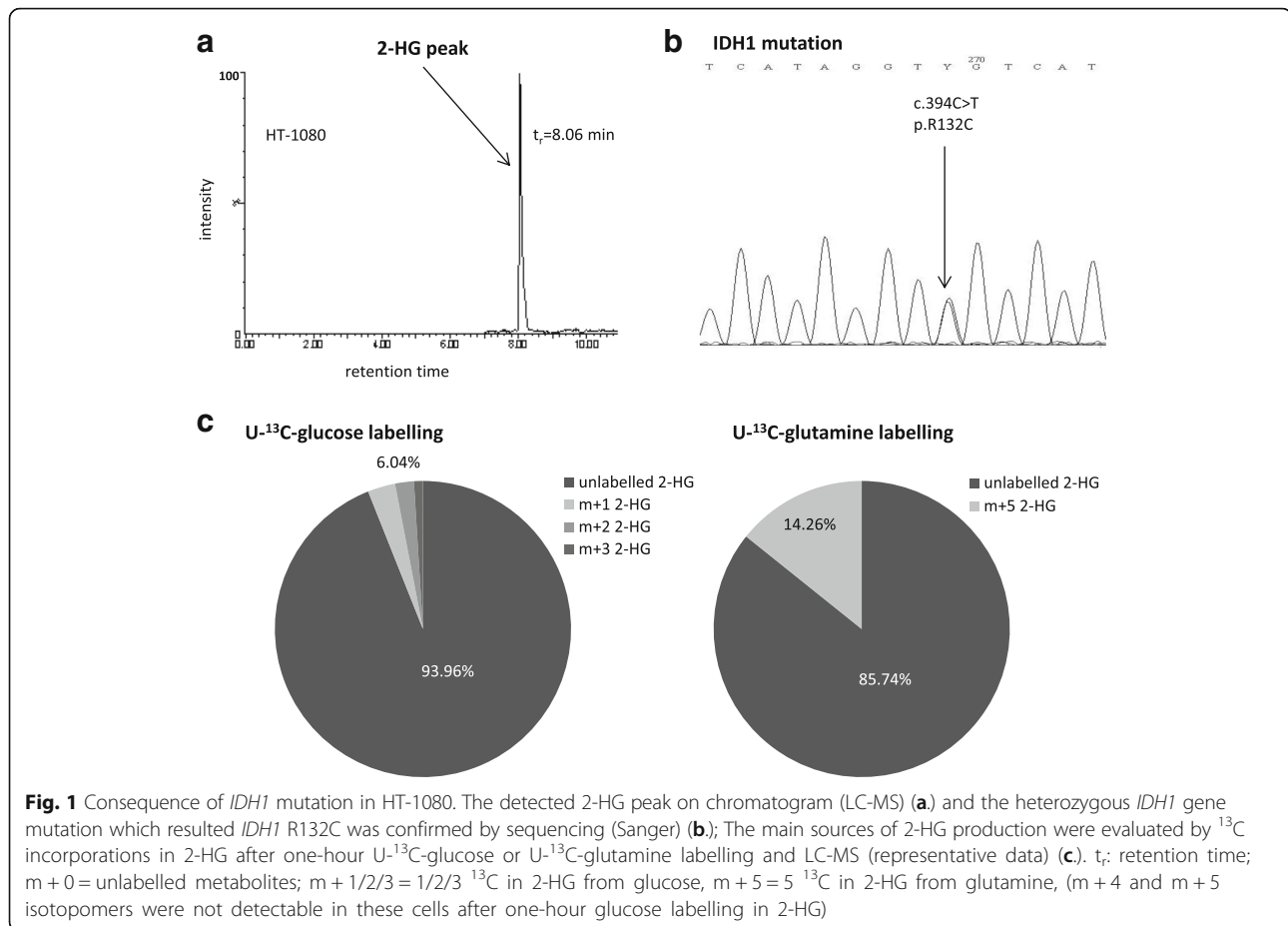
The data are presented as mean ± standard deviation and calculated from three independent experiments with minimum three or more parallels, depending on the used method. Data evaluation was performed using Student's *t* (two-tailed) test and variance analysis (ANOVA) for multiple comparisons with PAST 3.05 software. *p* < 0.05 was considered statistically significant.

Results

The source of elevated oncometabolite levels (lactate and 2-HG) in IDH1 mutant HT-1080 cells

Characterising the dominant bioenergetic process in HT-1080 fibrosarcoma cells increased glycolysis and impaired TCA (tricarboxylic acid) cycle were observed in our previous study [33]. 2-HG production (Fig. 1a) – high level of this oncometabolite was detected by LC-MS – and the decreased number and irregular arrangement of the cristae in mitochondria (electron microscopy-data not shown) represent other remarkable properties of HT-1080 cells. To elucidate the involvement of *IDH1* in the enhanced production of 2-HG the exons of *IDH1* gene were sequenced. Heterozygous *IDH1* gene mutation (R132C) was confirmed by Sanger sequencing in the studied HT-1080 cells (Fig. 1b).

High levels of lactate (~27 nmol/10⁶ cells) and 2-HG (~18 nmol/10⁶ cells) regarded as oncometabolites were characteristic features of HT-1080. The sources of the produced oncometabolites were studied after using different ¹³C labelled substrates (glucose, glutamine, acetate) and LC-MS. Incorporation of ¹³C atoms was shown in ~16% of lactate after one-hour ¹³C glucose labelling in HT-1080 cultures. However, neither U-¹³C glutamine nor 2-¹³C acetate could label lactate in these cells. Low level of ¹³C labelling from glucose was detected in 2-HG (~6% of total 2-HG pool), as well.



Acetate substrate could not label 2-HG. However, glutamine was proved to be a remarkable source (~15%) of 2-HG (Fig. 1c).

Rapamycin inhibited mTOR related protein expression, cell proliferation and migration of HT-1080 cells

The role of the described high mTORC1 activity [33] was studied in our work by rapamycin (mTORC1 inhibitor) treatment. Dose dependent anti-proliferative effect (0.1–200 ng/mL) of rapamycin was tested in vitro; based on the evaluation of our and other published results 50 ng/mL was selected for further in vitro studies. Both Alamar Blue test and the evaluation of cell number confirmed the time dependent effect (Fig. 2a) of 50 ng/mL rapamycin, as well. These were supported by flow cytometry, however, apoptotic effect was not detected after rapamycin treatment in these *IDH1* mutant cells after 24–72-h treatment (data not shown). The migration of HT-1080 cells was also inhibited after rapamycin treatment in ECM gels, the number of the migrated cells was reduced by more than 80%. Rapamycin sensitivity was confirmed after 48-h treatment by Western blot (Fig. 2b). Densitometric analysis showed significantly decreased expression in phosphorylated forms of S6 and mTOR

(more than 85% decreasing in both p-S6 and p-mTOR, besides the total level of S6 and mTOR did not change). In parallel, Raptor and Rictor expressions were also reduced.

Rapamycin decreased lactate and 2-HG oncometabolite production by reducing the amount of LDH-A and glutaminase enzymes

Significantly decreased intracellular levels of lactate and 2-HG were detected using LC-MS measurements after in vitro rapamycin treatment (Fig. 3a, b). Rapamycin altered the levels of various TCA cycle intermediates, as well; however, these changes were not proved to be significant (Fig. 3c). The effect of the remaining 2-HG and lactate levels in parallel with 48-72-h rapamycin treatment were also tested in vitro by adding 2-HG and/or lactate. In our experimental systems, we could not observe significant influences of lactate and/or 2-HG in proliferation, in growth potential and in rapamycin sensitivity of HT-1080 cells (Additional file 1: Figure S1.).

The metabolic effect was verified by using one-hour ¹³C-substrate labelling after 48-h rapamycin treatment and measuring-evaluating unlabelled and labelled metabolite levels by LC-MS. ¹³C atoms appeared in 16% of

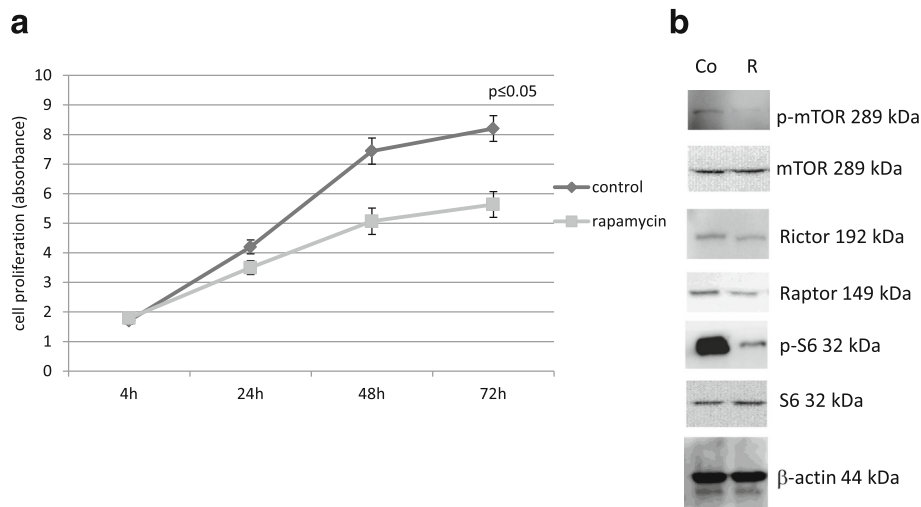


Fig. 2 In vitro effects of rapamycin in HT-1080 cells (anti-proliferative effect and the decreased expressions of mTOR activity related proteins). The anti-proliferative effect of rapamycin was confirmed by Alamar Blue test after 4-24-48-72-h (the results of a representative experiment $n = 6$, $*:p < 0.05$) (a). Reduced expressions of mTOR kinase activity related proteins (p-S6 and p-mTOR) were shown after 48-h rapamycin (50 ng/mL) treatment by Western blot analysis (representative blot) Co = control; R = rapamycin (b).

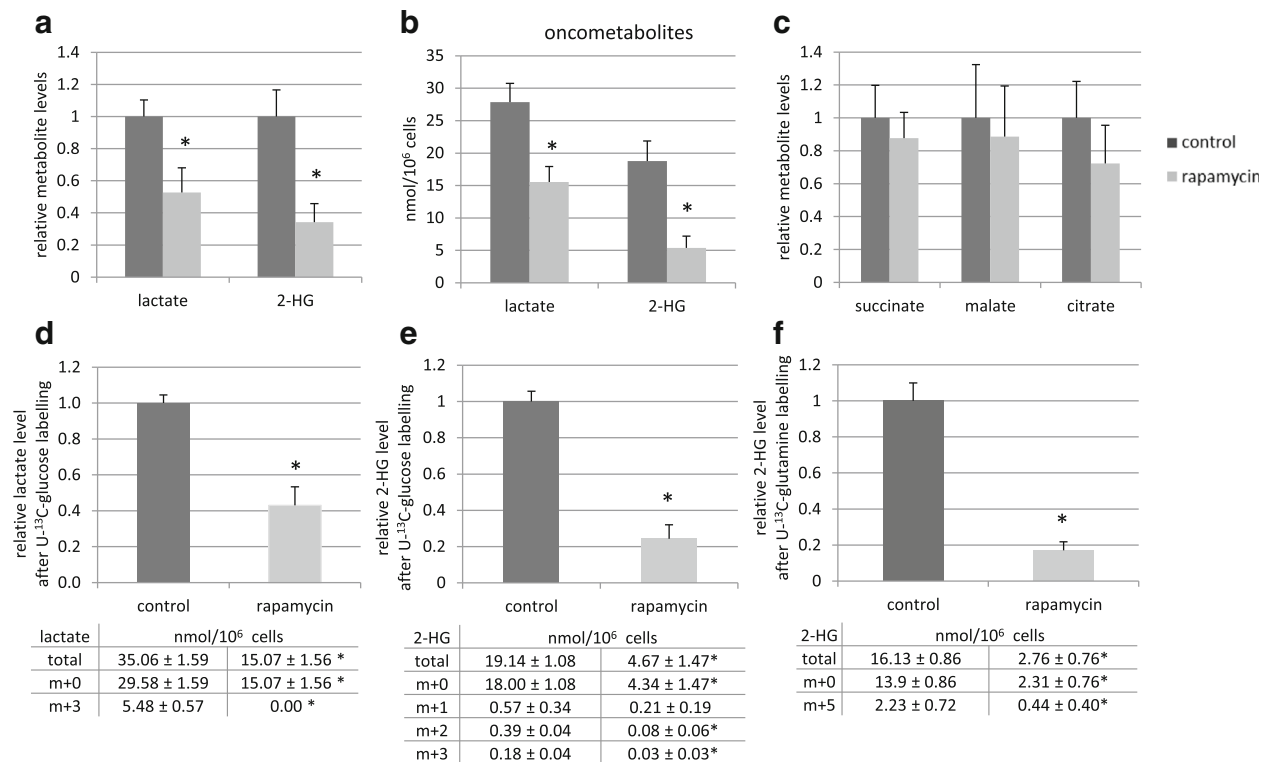


Fig. 3 Rapamycin treatment reduced lactate and 2-HG productions in vitro (LC-MS measurements). The relative levels of lactate and 2-HG (a); the levels of these oncometabolites in nmol/10⁶ cells (b); the relative levels of succinate, malate and citrate (c) after 48-h rapamycin treatment (50 ng/mL); The changes in relative level of total lactate (m + 0 and m + 3) were shown after 48-h rapamycin treatment and one-hour U-¹³C-glucose labelling (d); The reduced level of total 2-HG (m + 0 and m + 1/2/3) was also detected after rapamycin treatment and U-¹³C-glucose labelling (e) or U-¹³C-glutamine substrate labelling (f) m + 0 = unlabelled metabolites; m + 3 = 3 ¹³C in lactate from glucose, m + 1/2/3 = 1/2/3 ¹³C in 2-HG from glucose, m + 5 = 5 ¹³C in 2-HG from glutamine, (m + 4 and m + 5 isotopomers were not detectable in these cells after one-hour glucose labelling in 2-HG); Levels of metabolites were expressed relative to the control (control level = 1) and the tables show the absolute levels of labelled and unlabelled metabolites after rapamycin treatment. ($n = 3$, $*:p < 0.05$);

lactate from U-¹³C-glucose in control HT-1080 cells at these experimental conditions. 48-h rapamycin treatment reduced the level of total lactate (both ¹²C- and ¹³C-lactate) by more than 50% and blocked the incorporation of ¹³C from U-¹³C-glucose into lactate using one-hour labelling period at the end of the treatments (Fig. 3d). 2-HG production was also reduced effectively after rapamycin treatment, U-¹³C-glucose and U-¹³C-glutamine labelling studies confirmed that rapamycin inhibited 2-HG production. The total level of 2-HG was reduced by more than 75% and the amount of ¹³C-labelled 2-HG was also reduced significantly after using either glucose or glutamine labelling in one-hour time period in the treated cells compared to controls (Fig. 3e, f).

The regulatory role of mTORC1 activity in both LDH-A and glutaminase expressions were analysed by flow cytometry in these experiments. Rapamycin reduced the expression of LDH-A and glutaminase at protein levels in HT-1080 cells after 48-h treatment (Fig. 4a, b). These were further confirmed by Western blot, as well (Fig. 4c). The role of glutaminase enzyme activity in 2-HG production was proved by Zaprinast and BPTES treatments in HT-1080 cells. Similar to rapamycin, Zaprinast and BPTES could also reduce 2-HG production (Fig. 4d). This was occurred at enzyme activity level [34], as glutaminase inhibition did not influence the protein expression of glutaminase negatively (data not shown). Zaprinast also reduced the proliferation of HT-1080 cells

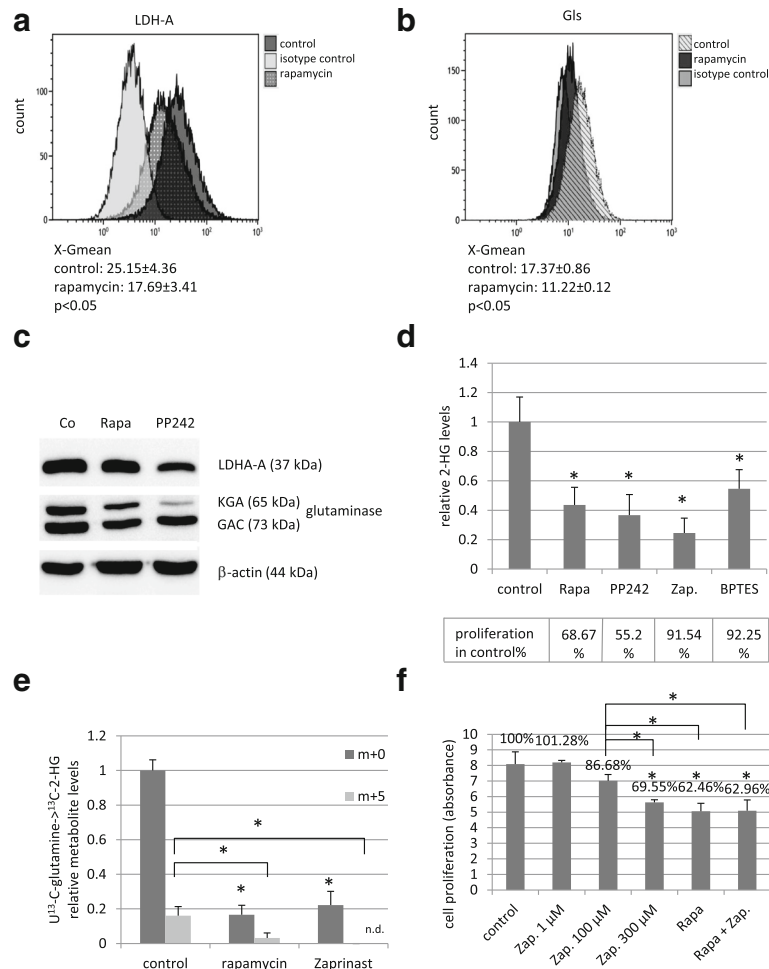


Fig. 4 mTOR inhibitors (rapamycin, PP242) decreased the expressions of LDH-A and glutaminase proteins in HT-1080 cells; and glutaminase inhibitors (Zaprinast, BPTES) have effects on both the proliferation and the 2-HG oncometabolite level in these cells. LDH-A and Gls expressions were significantly reduced after 48 h rapamycin (50 ng/ml) and PP242 (1 μM) treatment (**a.** and **b.** show flow cytometric results, X-Gmean average ± SD n = 3, *p < 0.05; **c.** Western blot). The effects of mTOR and glutaminase inhibitors on the 2-HG production and proliferation (**d.**) (Alamar Blue test; Rapa.: rapamycin 50 ng/mL; PP242: 1 μM; Zap.: Zaprinast 100 μM; BPTES: 10 μM). The effect of rapamycin and Zaprinast on the 2-HG production (**e.**) (LC-MS using U-¹³C-glutamine labelling; n = 3, levels of metabolites were expressed relative to the control (control level = 1), m + 0 = unlabelled 2-HG; m + 5 = ¹³C in 2-HG, n.d.: not detected; *p < 0.05). The results of Alamar Blue test after using 48-h Zaprinast and rapamycin (50 ng/ml) combination treatments in HT-1080 cells (**f.**)

in vitro (Fig. 4e, f). However, rapamycin was significantly more effective than Zaprinas after 48–72-h treatment. Moreover, rapamycin and Zaprinas showed no additive effect on proliferation, this combination was not more effective than rapamycin alone (Fig. 4f).

To exclude non-target effect of rapamycin, as a chemical compound, we used another mTOR inhibitor (PP242) and compared their effects on 2-HG, lactate production and on LDH-A, Gls protein expression and on proliferation, as well. PP242 is an ATP-competitive compound, which is highly selective to mTOR kinase in both mTORC1 and C2 complexes; it is a non-FKBP12 binding drug as mTORC1 inhibitor rapamycin. In addition, PP242 has similar effects on proliferation, Gls and LDH-A protein level (Fig. 4c, d), in parallel PP242 reduced the lactate level near to 60%, the 2-HG level near to 40%. These suggest that the inhibition of mTOR kinase is involved in the alteration of these parameters.

The lactate production of highly glycolytic other non-IDH mutant cell lines were also tested after in vitro rapamycin treatment in two human Hodgkin lymphoma cells and in another previously metabolically characterised ZR-75.1 human breast carcinoma cell line. 48–72 h rapamycin treatment could reduce the amount of lactate in these cells; the unlabelled lactate levels were significantly reduced to 85%–65% (DEV-75%, KMH2-85%, ZR-75.1–65%) in these other malignant cells. The use of one-hour $U\text{-}^{13}\text{C}$ -glucose labelling at the end of rapamycin treatments could confirm these changes, the labelled ^{13}C -lactate level decreased to 30% in DEV and near to undetectable level in the other two cell lines in our experiments. Furthermore, we have chance to analyse 2-HG production of a generated (genetically modified) homozygous *IDH1* mutant glioma cell line – U251 MG. In these cells, we detected high 2-HG production (~ 24 nmol/ 10^6 cells), however, the known low glycolytic capacity of this kind of glioma cells was also observed. The elevated 2-HG and proliferation levels were significantly reduced (near to 75% and 80%, respectively) after 48-h mTOR inhibitor treatment which confirmed our findings about the 2-HG reducing effect of rapamycin treatment in other 2-HG producing tumour type, in glioma cells.

Rapamycin inhibited the growth and the oncometabolite production in HT-1080 xenografts in vivo

The in vivo inhibitory effect of mTORC1 inhibitor Rapamune (oral rapamycin drug) on tumour growth was also confirmed in HT-1080 xenotransplanted SCID mice. Rapamune treatment significantly reduced tumour weights and tumour volumes in vivo (Fig. 5a, b). The in vivo inhibitory effect of the applied treatment on mTORC1 activity and on the expression of Gls and LDH-A were confirmed by using p-S6, p-mTOR, Gls and LDH-A

immunostainings (Additional file 2: Figure S2.). The significantly reduced oncometabolite levels – lactate and 2-HG – were also detected by LC-MS in frozen tumour tissues of HT-1080 xenografts (Fig. 5c, d).

Discussion

Several studies have shown that metabolic intermediates have potential to modulate oncogenic (including cellular and extracellular mechanisms) and epigenetic processes. Moreover, the accumulation of certain metabolites with normal or altered structures – designated as oncometabolites – may contribute to carcinogenesis in many aspects [35, 36].

Noteworthy, oncometabolites are interconnected and form a network to act by cooperative or autoregulated manner in tumorigenesis, as well [35–38]. Recently, Kottakis et al. have supported this network concept especially at epigenetic level in correlation with the functions of mTOR controlled pathways [39]. This work underlines the importance of our new data about mTOR activity dependent regulation of lactate and 2-HG productions in *mIDH1* HT-1080 fibrosarcoma. The presented data showed that mTOR complex inhibitors – in parallel reduce tumour growth and migration – have significant inhibitory effect on the productions of both glycolytic lactate and mainly from glutamine sourced 2-HG oncometabolites in vitro and in vivo. According to our results and the known microenvironmental tumour promoting effects of tumour derived lactate, not only the well-known anti-proliferative effect of mTOR inhibitors should be considered. The altered levels of oncometabolites, especially their potential extracellular effects should also be taken into account in case of starting to use rapalog treatments. For example, doxorubicin inhibits the proliferation, however, it could not significantly alter the studied oncometabolite levels in HT-1080 cells (data not shown, unpublished results). The reduction of lactate and 2-HG oncometabolites could have fewer effects on stable tumour cell lines in short-term treatments than in their microenvironment and in the associated inflammatory or other “normal” (non-tumour) cells at tissue level. The reduced levels of oncometabolites are interesting for further studies because rapamycin preferentially reduced the productions of lactate and 2-HG relative to succinate, malate and citrate. Our observations call the attention to the translational effects of mTOR activity [37, 40], which were proved by the detected decrease of LDH-A and Gls expressions at protein level both in vitro and in vivo (Fig. 6.).

As far as the regulatory role of mTOR in protein translation is concerned, there are only limited data about mTOR hyperactivity dependent metabolic alterations related to oncometabolite productions, especially 2-HG. The detected correlation between hyperactivated

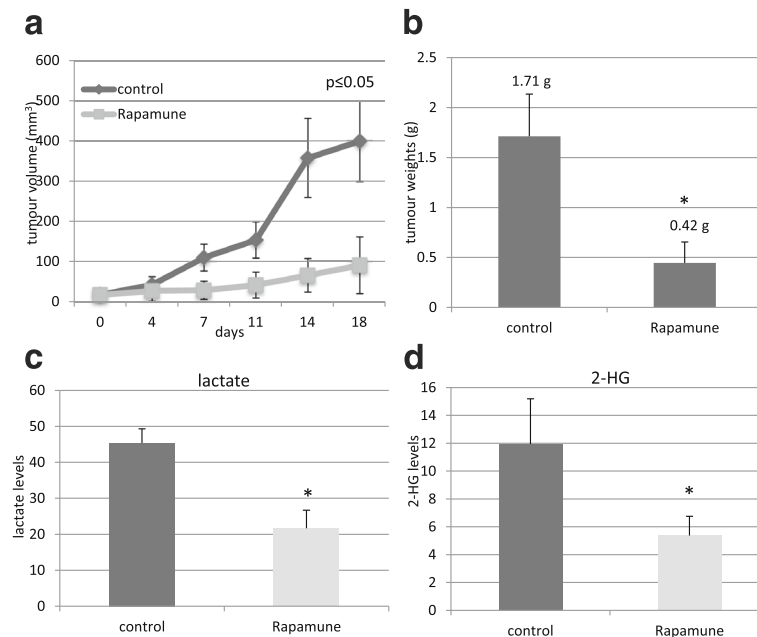


Fig. 5 The effects of rapamycin on tumour growth and on oncometabolite production *in vivo*. Growth curve of the tumour (a), and the measured tumour weights (b), lactate (c) and 2-HG (d) levels of control and Rapamune (3 mg/kg, 3 weeks) treated HT-1080 xenografts (LC-MS, $n = 6, *p < 0.05$; metabolite levels in nmol/10 mg tumour mass were given

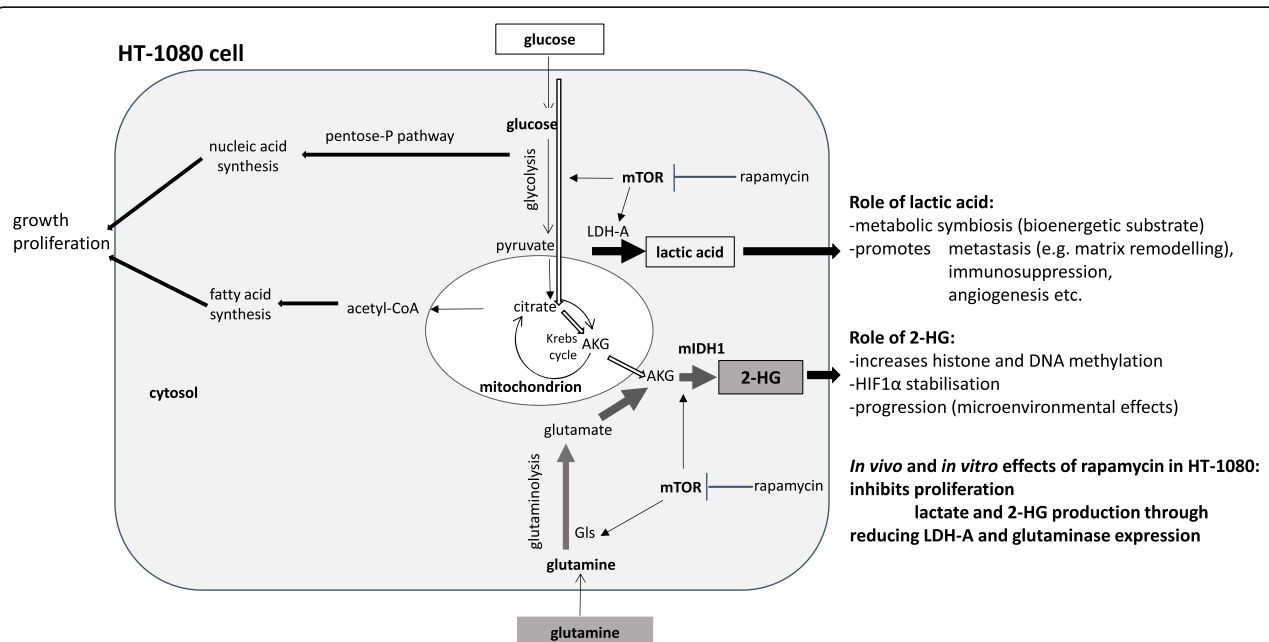


Fig. 6 The effect of rapamycin on metabolic profile of *IDH1* mutant HT-1080 cells. Rapamycin treatment reduced the levels of two oncometabolites in parallel - lactate and 2-HG - in high glycolytic, *IDH1* mutant fibrosarcoma cells. mTOR inhibition decreased metabolic capacity, the glycolysis and the glutaminolysis with remarkable downregulation of LDH-A and glutaminase enzyme expressions in HT-1080 cells (further explanation in the discussion)

mTOR and LDH expressions and the related lactate production corresponds to the known regulatory role of mTOR activity in the expressions of glycolytic enzymes [41, 42]. Various interactions between mTOR activity and metabolic alterations including oncometabolite production have been studied in few available reports applying different experimental conditions. It has been reported that 2-HG could equally activate and inhibit mTOR in different cells (genetically manipulated glioblastoma, *C. elegans* etc.) [43, 44]. Since different biological systems have been used in these experiments, there is a possibility that the outcome of 2-HG action has been influenced by different modulators such as origin and timing of their presence. However, these antagonistic impacts between oncometabolites and mTOR activity may suggest a possible coordination of lactate and 2-HG for joint tumour promoting functions. Nevertheless, it is noteworthy that our conclusion based on the obtained results – with an established primarily heterozygous mutant *IDH1* fibrosarcoma cell line – are in harmony with those reported by Carbonneau et al [44]. Their results have demonstrated mTOR kinase activation in other models in different tumour cells (HeLa, immortalized astrocytes) after octyl-2-HG treatment or in newly mIDH transfected cells.

Herein we confirmed their findings that mIDH can lead both to 2-HG production and to aberrant activation of mTOR kinase [44] using other primarily endogenous heterozygous *IDH1* mutant cell line. However, our new findings provide that the hyperactivity of mTOR kinase is needed to produce 2-HG in the studied primarily *IDH1* mutant cells.

Nevertheless, the presented data support our view that the detected reductions at different oncometabolite levels correlate to the inhibited proliferation, migration after rapamycin treatment in HT-1080 cells in vitro. The detected decrease of mTOR activity and its correlation with diminished oncometabolite level and tumour growth were also demonstrated in vitro xenografts in our study. This effect of rapamycin treatment highlights the importance of mTOR activity in malignant phenotype of *IDH1* mutant cells. Our results – concerning the potential roles of mTOR activity and 2-HG production in migration of malignant cells – confirm the recently published data about the enhanced migration capacity of mIDH1 transfected glioma cells [45]. Only this study and our work show the potential benefit of mTOR inhibitors on the migration of IDH mutation related malignant cellular phenotype, in this context.

The anti-tumour effects of rapalogs, other mTOR inhibitors and elevated mTOR activity have been described previously in many tumours including gliomas, AMLs and chondrosarcomas (where the occurrence of the IDH mutation is remarkable) [46]. Rapalogs and

newly developed mTOR inhibitors are being tested with recurrent and therapy resistant malignancies, especially in AML and glioma patients [47–49].

Based on our recent findings and the emerging data about the relation between high mTOR activity and IDH mutation, we also highlight the importance of recently ongoing and future studies in different AMLs, gliomas, and sarcomas. We also suggest studying the metabolic profile, IDH status or oncometabolite productions – e.g. lactate and 2-HG level – in these patients. Our results showed that the endogenous mutant *IDH1* expressing HT-1080 fibrosarcoma cells with glycolytic phenotype proved to be a suitable model to characterise the role of mTOR in the regulation of 2-HG and lactate productions. The present study provided evidence for the first time for simultaneous reduction of two oncometabolites (lactate and 2-HG) by mTOR inhibitor. Moreover, we could detect such a reducing effect of rapamycin in oncometabolite level, especially in glycolytic lactate production in other lymphoma and breast cancer cells.

Other laboratories – with separate studies on either lactate or 2-HG expression – have described that specific glycolysis or glutaminolysis inhibitors (such as deoxyglucose or Zaprinast, BPTES) can reduce the cellular proliferation in vitro, however, they have no significant efficacy in vivo in monotherapy [34, 50, 51]. The mTOR inhibitors (rapamycin mTORC1 and PP242 C1-C2 inhibitors) showed high efficacy in our study. Rapamycin and PP242 significantly inhibited tumour growth in HT-1080 IDH mutant cells, where the productions of two oncometabolites were also attenuated. High concentrations of lactate and 2-HG exert tumour promoting potential in a cooperative manner with the surveillance of mTOR activity (e.g. 2-HG initiates DNA hypermethylation and lactate fuels the bioenergetic process) [16, 52] which can be present in the studied HT-1080 cells. Certainly, the above outlined network and its role in the potential metabolic symbiosis of the tissue microenvironment could be regarded as an important phenomenon. However, this cannot be denoted as an exclusive mechanism to maintain malignant phenotype of HT-1080 fibrosarcoma cells. In addition, it has been published recently by E. Allen et al. that inhibition of mTOR in combination can disrupt the metabolic symbiosis of normoxic and hypoxic cells in the developing targeted therapy resistance [53]. This and our new results suggest that targeting mTOR activity could have a promising potential in different new combination treatments depending on the metabolic phenotype of tumours.

These and our recent findings highlight that tumour promoting mechanisms supported jointly by lactate and 2-HG oncometabolites – regulated by mTOR dependent translational effects –, and especially the role of metabolic

crossroads would be a promising approach to recognise a set of molecular targets for anticancer therapy.

Conclusions

In conclusion, the mTORC1 inhibitor (rapamycin) showed high efficacy in our models. The high mTOR activity related biological advances in tumour proliferation were inhibited by rapamycin both in vitro and in vivo in the studied heterozygous *IDH1* mutant cells. Moreover, the altered metabolic profile, the consequences of metabolic adaptation to *IDH1* mutation and to other tumourigenic alterations (e.g. hyperactivated glycolytic pathway) such as the high levels of two oncometabolites – 2-HG and lactate – were also disrupted after the specific effect of rapamycin treatment. Considering the role of these oncometabolites in intracellular and microenvironmental regulatory networks and their role in metabolic symbiosis it could be regarded that rapamycin and other developing mTOR inhibitors may have additional effects besides their anti-proliferative effects in different tumours with characteristic highly glycolytic phenotype, especially in case of *IDH1* mutation (such as AML, gliomas, chondrosarcomas). Based on our new results we could suggest targeting mTOR activity depending on the metabolic besides molecular genetic phenotype of tumours to increase the success of the future therapies.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Adding 2-HG, lactate did not influence the anti-proliferative effect of rapamycin treatment in HT-1080 cells. The in vitro anti-proliferative effect of rapamycin (50 ng/ml), Na-L-lactate (5 mM) and D-2-HG (0.5 mM) combination treatments were studied by Alamar Blue test after 48–72 h (the results of a representative experiment $n = 6$, $*p < 0.05$; Rapa = rapamycin, 2-HG = 2-hydroxyglutarate, lac = lactate) (PDF 147 kb).

Additional file 2: Figure S2. The representative photos of p-mTOR, p-S6, LDH-A and Gls immunostainings in HT-1080 xenograft tumours. The expressions of p-mTOR, p-S6, LDH-A and Gls were studied in control and Rapamune treated xenograft tumours (DAB-brown staining; magnification 400X) (PDF 209 kb).

Abbreviations

2-HG: 2-hydroxyglutarate; 4-EBP1: 4E-binding protein; Akt: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog; AML: Acute myeloid leukemia; FH: Fumarate hydratase; Gls: Glutaminase; IDH: Isocitrate dehydrogenase; LDH: Lactate dehydrogenase; mIDH: Mutant isocitrate dehydrogenase; mTOR: Mammalian target of rapamycin; p70S6K: Phospho70S6 kinase; PI3K: Phosphatidylinositol-3-kinase; PKC: Protein kinase C; SDH: Succinate dehydrogenase; SGK1: Serum/glucocorticoid regulated kinase 1; TCA: Tricarboxylic acid.

Acknowledgments

The authors would like to thank Csaba Bödör and Péter Attila Király (1st Department of Pathology and Experimental Cancer Research, Semmelweis University) for their kind help in *IDH1* gene sequencing; András Sztodola and Zsuzsa Kaminsky for their assistance in xenograft experiments and in histological processing of xenograft samples; Andrea Reszegi for her help in Western blot experiments. We would like to thank William Leenders who kindly provided U251 MG mutant *IDH1* transfected cell line for our research group. We also grateful to László Tretter and László Kopper for their careful

reading and helpful advices during the manuscript preparation. The LC-MS measurements were performed in a collaboration with the MS Proteomics Research Group of the RCNS, HAS.

Funding

The research work was supported by Bolyai Fellowship and Medinprot Synergy IV. Program of the Hungarian Academy of Sciences (A.S.) and Hungarian National Talent and National Excellence Programs (N.N.: supported by the ÚNKP-16-3 New National Excellence Program of the Ministry of Human Capacities; Z.H.: supported by the NTP-NFTÖ-16 Hungarian National Talent Program of the Ministry of Human Capacities). Z.H.'s PhD research work was supported by Richter Centenarium Foundation Fellowship-2016.

Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this manuscript. Further details are available on request.

Author's contributions

Conception and design: ZH, AJ, AS. Development of methodology: NS, LD, OO, CK, ZH. Acquisition of data (provided animals, provided facilities, etc.): ZH, GP, TD, SP. Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): ZH, IK, NN, AS, NS. Writing, review, and/or revision of the manuscript: ZH, AJ, TD, AS. Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): TD, NN, IK, GP, ZH. Study supervision: AS. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no potential competing interest.

Consent for publication

Not applicable.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹1st Department of Pathology and Experimental Cancer Research, Semmelweis University, Üllői út 26, Budapest 1085, Hungary. ²Laboratory of Environmental Chemistry and Bioanalytics, Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemistry, Eötvös Loránd University, 1518 Budapest, Hungary. ³Tumor Progression Research Group of Joint Research Organization of Hungarian Academy of Sciences and Semmelweis University, Budapest, Hungary. ⁴Hungarian Academy of Sciences, Research Centre for Natural Sciences, MS Proteomics Research Group, 1117 Budapest, Hungary.

Received: 17 March 2017 Accepted: 26 May 2017

Published online: 02 June 2017

References

- Laplanche M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 2012;149(2):274–93.
- Shimobayashi M, Hall MN. Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15(3):155–62.
- Albert V, Hall MN. mTOR signaling in cellular and organismal energetics. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;33:55–66.
- Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. MTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(1):21–35.
- Dienstmann R, Rodon J, Serra V, Tabernero J. Picking the point of inhibition: a comparative review of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors. *Mol Cancer Ther*. 2014;13(5):1021–31.
- Sticz T, Molnár A, Márk Á, Hajdu M, Nagy N, Végső G, et al. mTOR activity and its prognostic significance in human colorectal carcinoma depending on C1 and C2 complex-related protein expression. *J Clin Pathol* 2016 doi:10.1136/jclinpath-2016-203913.
- Bian Y, Wang Z, Xu J, Zhao W, Cao H, Zhang Z. Elevated Rictor expression is associated with tumor progression and poor prognosis in patients with gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;464(2):534–40.

8. Wildey G, Behtaj M, Kresak A, Yang M, Fu P, Dowlati A. RICTOR amplification identifies a subgroup in small cell lung cancer and predicts response to drugs targeting mTOR. *Oncotarget*. 2016. doi:10.18632/oncotarget.13362.
9. Makinoshima H, Takita M, Saruwatari K, Umemura S, Obata Y, Ishii G, et al. Signaling through the Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Axis Is Responsible for Aerobic Glycolysis mediated by Glucose Transporter in Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-mutated Lung Adenocarcinoma. *J Biol Chem*. 2015;290(28):17495–504.
10. Yu L, Chen X, Wang L, Chen S. The sweet trap in tumors: aerobic glycolysis and potential targets for therapy. *Oncotarget*. 2016;7(25):38908–26.
11. Villar VH, Merhi F, Djavaheri-Mergny M, Durán RV. Glutaminolysis and autophagy in cancer. *Autophagy*. 2015;11(8):1198–208.
12. Puspapati RV, Daemen A, Wilson C, Sandoval W, Gao M, Haley B, et al. mTORC1-Dependent Metabolic Reprogramming Underlies Escape from Glycolysis Addiction in Cancer Cells. *Cancer Cell*. 2016;29(4):548–62.
13. Tanaka K, Sasayama T, Irino Y, Takata K, Nagashima H, Satoh N, et al. Compensatory glutamine metabolism promotes glioblastoma resistance to mTOR inhibitor treatment. *J Clin Invest*. 2015;4:1591–602.
14. Li J, Shin S, Sun Y, Yoon SO, Li C, Zhang E, et al. mTORC1-Driven Tumor Cells Are Highly Sensitive to Therapeutic Targeting by Antagonists of Oxidative Stress. *Cancer Res*. 2016;76(16):4816–27.
15. Zha X, Sun Q, Zhang H. mTOR upregulation of glycolytic enzymes promotes tumor development. *Cell Cycle*. 2011;10(7):1015–6.
16. Van Hée VF, Pérez-Escuredo J, Cacace A, Copetti T, Sonveaux P. Lactate does not activate NF- κ B in oxidative tumor cells. *Front Pharmacol*. 2015;6:228.
17. Nowicki S, Gottlieb E. Oncometabolites: tailoring our genes. *FEBS J*. 2015; 282(15):2796–805.
18. Morin A, Letouzé E, Gimenez-Roqueplo AP, Favier J. Oncometabolites-driven tumorigenesis: From genetics to targeted therapy. *Int J Cancer*. 2014; 135(10):2237–48.
19. Payen VL, Porporato PE, Baselet B, Sonveaux P. Metabolic changes associated with tumor metastasis, part 1: tumor pH, glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(7):1333–48.
20. Marchiq I, Pouyssegur J. Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate/H⁺ symporters. *J Mol Med (Berl)*. 2016;94:155–71.
21. Yoshida GJ. Metabolic reprogramming: the emerging concept and associated therapeutic strategies. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015;34:111.
22. Oermann EK, Wu J, Guan KL, Xiong Y. Alterations of metabolic genes and metabolites in cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2012;23(4):370–80.
23. Clark O, Yen K, Mellinger IK. Molecular Pathways: Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Cancer. *Clin Cancer Res*. 2016;22(8):1837–42.
24. Chen JY, Lai YS, Tsai HJ, Kuo CC, Yen BL, Yeh SP, et al. The oncometabolite R-2 hydroxyglutarate activates NF- κ B-dependent tumor-promoting stromal niche for acute myeloid leukemia cells. *Sci Rep*. 2016;6:32428.
25. Waitkus MS, Diplasi BH, Yan H. Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas. *Neuro-Oncology*. 2016;18(1):16–26.
26. Esmaili M, Hamans BC, Navis AC, van Horsen R, Bathen TF, Gribbestad IS, Leenders WP, Heerschap A. IDH1 R132H mutation generates a distinct phospholipid metabolite profile in glioma. *Cancer Res*. 2014;74(17):4898–907.
27. Nagy N, Hajdu M, Márk Á, Király PA, Tóth M, Dankó T, et al. Growth inhibitory effect of rapamycin in Hodgkin-lymphoma cell lines characterized by constitutive NOTCH1 activation. *Tumour Biol*. 2016;37(10):13695–704.
28. Pogány G, Timár F, Oláh J, Harisi R, Polony G, Paku S, et al. Role of the basement membrane in tumor cell dormancy and cytotoxic resistance. *Oncology*. 2001;60(3):274–81.
29. Szoboszlai N, Guo X, Ozohanics O, Oláh J, Gömöry Á, Mihucz VG, et al. 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*. 2014;819:108–15.
30. Jaitz L, Mueller B, Koellensperger G, Huber D, Oburger E, Puschenreiter M, et al. LC-MS analysis of low molecular weight organic acids derived from root exudation. *Anal Bioanal Chem*. 2011;400(8):2587–96.
31. Li L, Paz AC, Wilky BA, Johnson B, Galoian K, Rosenberg A, et al. Treatment with a Small Molecule Mutant IDH1 Inhibitor Suppresses Tumorigenic Activity and Decreases Production of the Oncometabolite 2-Hydroxyglutarate in Human Chondrosarcoma Cells. *PLoS One*. 2015; 10(9):e0133813.
32. Krencz I, Sebestyén A, Fábrián K, Márk Á, Moldvay J, Khor A, et al. Expression of mTORC1/2-related proteins in primary and brain metastatic lung adenocarcinoma. *Hum Pathol* 2016 doi:10.1016/j.humpath.2016.12.012. (Epub ahead of print).
33. Jeney A, Hujber Z, Szoboszlai N, Fullár A, Oláh J, Pap É, et al. Characterisation of bioenergetic pathways and related regulators by multiple assays in human tumour cells. *Cancer Cell Int*. 2016;16:4.
34. Elhammali A, Ippolito JE, Collins L, Crowley J, Marasa J, Piwnicka-Worms D. A high-throughput fluorimetric assay for 2-hydroxyglutarate identifies Zaprinast as a glutaminase inhibitor. *Cancer Discov*. 2014;4(7):828–39.
35. Gao X, Locasale JW. Serine metabolism links tumor suppression to the epigenetic landscape. *Cell Metab*. 2016;24(6):777–9.
36. Colvin H, Nishida N, Konno M, Haraguchi N, Takahashi H, Nishimura J, et al. Oncometabolite D-2-Hydroxyglutarate directly induces epithelial-mesenchymal transition and is associated with distant metastasis in colorectal cancer. *Sci Rep*. 2016;6:36289.
37. Sciacovelli M, Gonçalves E, Johnson TI, Zecchini VR, da Costa AS, Gaude E, et al. Fumarate is an epigenetic modifier that elicits epithelial-to-mesenchymal transition. *Nature*. 2016;537(7621):544–7.
38. Li F, He X, Ye D, Lin Y, Yu H, Yao C, et al. NADP(+)-IDH Mutations Promote Hypersuccinylation that Impairs Mitochondria Respiration and Induces Apoptosis Resistance. *Mol Cell*. 2015;60(4):661–75.
39. Kottakis F, Nicolay BN, Roumane A, Karnik R, Gu H, Nagle JM, et al. LKB1 loss links serine metabolism to DNA methylation and tumorigenesis. *Nature*. 2016;539(7629):390–5.
40. Li J, Kim SG, Blenis J. Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab*. 2014;19(3):373–9.
41. Chen X, Zhu Y, Wang Z, Zhu H, Pan Q, Su S, et al. mTORC1 alters the expression of glycolytic genes by regulating KPNA2 abundances. *J Proteomics*. 2016;136:13–24.
42. Düvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, Souza AL, et al. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell*. 2010;39(2):171–83.
43. Fu X, Chin RM, Vergnes L, Hwang H, Deng G, Xing Y, et al. 2-Hydroxyglutarate Inhibits ATP Synthase and mTOR Signaling. *Cell Metab*. 2015;22(3):508–15.
44. Carbonneau M, M Gagné L, Lalonde ME, Germain MA, Motorina A, Guiot MC, et al. 2-hydroxyglutarate activates the mTOR signalling pathway. *Nat Commun*. 2016;7:12700.
45. Zhu H, Zhang Y, Chen J, Qiu J, Huang K, Wu M, et al. IDH1 R132H Mutation Enhances Cell Migration by Activating AKT-mTOR Signaling Pathway, but Sensitizes Cells to 5-FU Treatment as NADPH and GSH Are Reduced. *PLoS One*. 2017;12(1):e0169038.
46. Tan P, Soo Tiong I, Fleming S, Pomilio G, Cummings N, Droogleever M, et al. The mTOR inhibitor everolimus in combination with azacitidine in patients with relapsed/refractory acute myeloid leukemia: a phase Ib/II study. *Oncotarget*. 2016. doi:10.18632/oncotarget.13699. Epub ahead of print.
47. Brenner AK, Andersson Tvedt TH, Bruserud Ø. 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* 2016;21(11).
48. Miller JJ, Wen PY. Emerging targeted therapies for glioma. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2016;21(4):441–52.
49. Becher OJ, Gilheeny SW, Khakoo Y, Lyden DC, Haque S, De Baganca KC, et al. A phase I study of perifosine with temsirolimus for recurrent pediatric solid tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2016 doi: 10.1002/pbc.26409. (Epub ahead of print).
50. Zhao X, Jiang P, Deng X, Li Z, Tian F, Guo F, et al. Inhibition of mTORC1 signaling sensitizes hepatocellular carcinoma cells to glycolytic stress. *Am J Cancer Res*. 2016;6(10):2289–98.
51. Chen L, Cui H, Fang J, Deng H, Kuang P, Guo H, et al. Glutamine deprivation plus BPTES alters etoposide- and cisplatin-induced apoptosis in triple negative breast cancer cells. *Oncotarget*. 2016;7(34):54691–701.
52. Jin Y, Elalaf H, Watanabe M, Tamaki S, Hinoeno S, Matsunaga K, et al. Mutant IDH1 Dysregulates the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Association with Gene-Specific Histone Modifications to Cartilage- and Bone-Related Genes. *PLoS One*. 2015;10(7):e0131998. doi:10.1371/journal.pone.0131998.
53. Allen E, Miéville P, Warren CM, Saghafeinia S, Li L, Peng MW, et al. Metabolic Symbiosis Enables Adaptive Resistance to Anti-angiogenic Therapy that Is Dependent on mTOR Signaling. *Cell Rep*. 2016;15(6):1144–60.

RESEARCH

Open Access



GABA, glutamine, glutamate oxidation and succinic semialdehyde dehydrogenase expression in human gliomas

Zoltán Hujber¹, Gergő Horváth², Gábor Petővári¹, Ildikó Krencz¹, Titanilla Dankó¹, Katalin Mészáros³, Hajnalka Rajnai¹, Norbert Szoboszlai⁴, William P. J. Leenders⁵, András Jeney¹, László Tretter² and Anna Sebestyén^{1*}

Abstract

Background: Bioenergetic characterisation of malignant tissues revealed that different tumour cells can catabolise multiple substrates as salvage pathways, in response to metabolic stress. Altered metabolism in gliomas has received a lot of attention, especially in relation to IDH mutations, and the associated oncometabolite D-2-hydroxyglutarate (2-HG) that impact on metabolism, epigenetics and redox status. Astrocytomas and oligodendrogliomas, collectively called diffuse gliomas, are derived from astrocytes and oligodendrocytes that are in metabolic symbiosis with neurons; astrocytes can catabolise neuron-derived glutamate and gamma-aminobutyric acid (GABA) for supporting and regulating neuronal functions.

Methods: Metabolic characteristics of human glioma cell models – including mitochondrial function, glycolytic pathway and energy substrate oxidation – in relation to IDH mutation status and after 2-HG incubation were studied to understand the Janus-faced role of IDH1 mutations in the progression of gliomas/astrocytomas. The metabolic and bioenergetic features were identified in glioma cells using wild-type and genetically engineered IDH1-mutant glioblastoma cell lines by metabolic analyses with Seahorse, protein expression studies and liquid chromatography-mass spectrometry.

Results: U251 glioma cells were characterised by high levels of glutamine, glutamate and GABA oxidation. Succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) expression was correlated to GABA oxidation. GABA addition to glioma cells increased proliferation rates. Expression of mutated IDH1 and treatment with 2-HG reduced glutamine and GABA oxidation, diminished the pro-proliferative effect of GABA in SSADH expressing cells. SSADH protein overexpression was found in almost all studied human cases with no significant association between SSADH expression and clinicopathological parameters (e.g. IDH mutation).

Conclusions: Our findings demonstrate that SSADH expression may participate in the oxidation and/or consumption of GABA in gliomas, furthermore, GABA oxidation capacity may contribute to proliferation and worse prognosis of gliomas. Moreover, IDH mutation and 2-HG production inhibit GABA oxidation in glioma cells. Based on these data, GABA oxidation and SSADH activity could be additional therapeutic targets in gliomas/glioblastomas.

Keywords: Glioma, Bioenergetics, IDH1 mutation, 2-hydroxyglutarate, Glutamine, GABA, Succinic semialdehyde dehydrogenase

* Correspondence: anna@korb1.sote.hu; hsebanna@gmail.com

¹1st Department of Pathology and Experimental Cancer Research, Semmelweis University, Üllői út 26, Budapest 1085, Hungary
Full list of author information is available at the end of the article



Introduction

Gliomas, glial cell derived central nervous system malignancies, are a heterogeneous, aggressive tumour type with poor prognosis. The incidence of isocitrate dehydrogenase (IDH) mutations is high in low-grade gliomas. Despite the fact that these malignancies are still incurable, patients with IDH-mutant gliomas have a better prognosis and response to chemo- and radiotherapy than patients with IDH wild-type tumours [1, 2]. IDH mutations can also be implicated in the formation of other tumour types (acute myeloid leukaemia – AML, chondrosarcomas, intrahepatic cholangiocarcinoma – ICC). In these non-glial malignancies, IDH mutations appear to confer a worse prognosis to the patient; although there is some controversy in case of ICC and AMLs [3, 4].

Based on highly detailed analyses of the genetic basis for malignant progression (gene amplifications, mutations, loss of chromosome arms, gene expression, DNA methylation status), several altered pathways in IDH-mutated gliomas were characterised, including RTK-PI3K-mTOR, Notch signalling, cell cycle and DNA damage response regulation. These studies concluded that IDH mutation is at the centre of epigenetic alterations in glioma cells [5, 6]. The prevalence of IDH mutation is high in grade II-III and secondary glioblastomas (70–80%), the most frequently (>90%) mutated IDH isoform is the cytosolic IDH1 R132H [7, 8], that has gained a neomorphic activity resulting in conversion of α -ketoglutarate (aKG) to the oncometabolite D-2-hydroxyglutarate (2-HG). In addition, the mutation has a negative impact on the function on the wild-type allele [9].

2-HG can accumulate to millimolar concentrations in cells and in the extracellular environment [10, 11]. Moreover, mutated IDH1 not only causes 2-HG production, but also initiates changes in metabolic adaptation of mutated cells [12]. Mutant IDH1 oxidises NADPH to NADP⁺ during 2-HG production, instead of reducing NADP⁺ to NADPH as is done by the wild-type IDH1 enzyme during conversion of isocitrate to aKG. Because 2-HG and aKG are structurally very similar metabolites, 2-HG acts as a competitive inhibitor of aKG-dependent dioxygenases including prolyl-hydroxylases, histone- and DNA demethylases [13–15]. Cancer-related metabolic alterations, adaptations and their role in tumorigenesis and progression are extensively studied in many cancers. The metabolic characterisation of human gliomas started with the reinterpretation of Warburg effect suggesting that other substrates than glucose can also be oxidised by glioma cells [12, 16, 17], such as glutamine and acetate [18–20].

Multiple substrates can fill up the TCA cycle – which is in the centre of metabolic activity – to provide acetyl-CoA; and many studies reported that cells can use glutamine and/or glutamate as catabolic substrates [21–23]. Previous results suggested that glioma cells adaptively run the TCA

cycle backwards to power the electron transport chain, especially in case of IDH-mutant cells. Analogous to fumarate hydratase (FH) and succinate dehydrogenase (SDH) mutations, which can also cause oncometabolite production, IDH mutation provides an example of how a single mutation can reprogram cellular metabolism and affect pathobiology [13, 15, 24].

Recent years have yielded exciting findings in the field of tumour metabolism, and some aspects of these metabolic alterations related to IDH mutations have also been described [25, 26].

Astrocytes and GABA-ergic and glutamatergic neurons play roles in the maintenance of the neurotransmitter pools of glutamate and gamma-aminobutyric acid (GABA). Astrocytes and neurons are in metabolic symbiosis, astrocytes can catabolise glutamate and GABA for supporting and regulating neuronal functions. GABA can feed the TCA cycle via the activities of GABA transaminase and succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) to produce succinate [27]. The expression changes of GABA utilisation enzymes and GABA consumption were only studied in few recent publications in cancer research [28, 29].

An emerging question is whether glioma cells have the ability to use the GABA shunt to support energy production and proliferation. This indicates a need to understand the effect of produced 2-HG (caused by IDH1 mutations) on the former pathway.

Our study provides an exciting opportunity to advance our knowledge of the effects of IDH1 mutation and 2-HG accumulation to identify several mechanisms which can help to understand the Janus-faced role of IDH1 mutations in the progression of gliomas – IDH mutations could be driver oncogenic alterations, however, IDH-mutant human gliomas have better prognosis than wild-type. In the present study, the alterations of bioenergetic characteristics and different substrate oxidation capacities in relation to the expressions of relevant proteins in glioma cell lines were analysed (Additional file 1: Figure S1 summarises the analysed pathways). Our presented results demonstrate that SSADH expression – an IDH mutation independent *in vivo* characteristic of human glioma cells – provides a possibility for GABA oxidation. This may have special importance in survival, proliferation and metabolic adaptation of glioma cells.

Methods

All materials were purchased from Merck-Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany), except where it is indicated in the text.

In vitro cell cultures

U251 MG (U251 wt), genetically engineered U251 MG mutant IDH1 R132H overexpressing (U251 IDH1m)

[25], U87 MG (ATCC) and U373 MG (kindly provided by G. Sáfrány) human astrocytoma/glioblastoma cells were cultured in DMEM high glucose medium supplemented with 10% foetal bovine serum, 2 mM L-glutamine and 100 UI/ml penicillin-streptomycin. R132H mutation status was confirmed by immunocytochemistry using anti-IDH1 R132H (Dianova, H09 clone, 1:80) antibody in different cell lines after paraformaldehyde (4%) fixation. For metabolic flux experiments, cells were washed with DMEM D5030 (glucose-, glutamine- and pyruvate-free medium) followed by incubation with DMEM D5030 medium containing U-¹³C-glucose, U-¹³C-glutamine or 2-¹³C-acetate (Cambridge Isotope Laboratories Inc.). T25 or T75 flasks (for Western blot, liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and ¹³C-labelling experiments) and 96-well plates (sulforhodamine-B and Alamar Blue proliferation assays), special Seahorse plates were used with appropriate cell numbers ($3-8 \times 10^5$ cells/flask or $2.5 \times 10^3 - 5 \times 10^4$ cells/well) for different treatments and measurements. To analyse the direct effect of 2-HG accumulation and the role of GABA metabolism in U251 wt cells, 4 mM 2-HG, 5 mM GABA and 0.6 mM vigabatrin were added for various time periods (24 h, 72 h and 14/28 days). We selected concentrations based on previous publications.

Cell proliferation measurements

Beside cell counting the proliferation rate was analysed by sulforhodamine-B (SRB) assay which correlates to the protein content of the analysed samples. For 72-h proliferation assays 2.5×10^3 untreated or pre-treated glioma cells/100 μ l well were seeded; followed by incubation under different conditions. Thereafter the cells were fixed with 10% trichloroacetic acid subsequently stained with SRB using 10 mM Tris, and the absorbance was measured at 570 nm. In addition, Alamar Blue (Thermo Fisher Scientific) test was also used for proliferation studies. The incubation period was 4 h, fluorescence was measured by Fluoroskan Ascent FL fluorimeter software (Labsystems International). Percentages of proliferation were given relative to control samples.

Expression analysis of different proteins by Western blot

Protein concentrations of cell extracts were measured with using Bradford assay (Biorad). Equal amounts of proteins were separated by 8–12% SDS-PAGE gels following their transfer to PVDF membrane applying BioRad Trans Blot Cell. Membranes were stained with Ponceau S, before incubation the following primary antibodies were used in expression studies: anti-phosphofructokinase P (PFKP) (Cell Signaling 1:1000 #8164); anti-hexokinase 2 (HK2) (Cell Signaling 1:1000 #2867); anti- β -F1-ATPase (ATPB) (Abcam 1:2000 #14370), anti-glutaminase (Gls) (Abcam 1:1000 #156876); anti-acetyl-CoA synthetase 2 (ACSS2) (Cell Signaling 1:1000 #3658); anti-alanine, serine, cysteine

-preferring transporter 2 (ASCT2) (Bethyl 1:2000 #A304-353A); anti-succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) (Abcam 1:1000 #129017); anti-GABA transporter 1 (GAT1) (Abcam 1:500 #426). Finally, biotinylated secondary antibodies, Vectastain Elite ABC Kit (Vector) and enhanced chemiluminescence technique (Thermo Fisher Scientific ECL Western Blotting Substrate) were applied by using C-Digit System (Li Cor Biosciences) detection equipment. The membranes were stripped and probed by anti- β -actin antibody (Sigma-Aldrich; #A228; 1:5000), to prove equal protein loading as well.

Assay to detect cellular respiration and extracellular pH changes

Real-time measurements of oxygen consumption rate (OCR), reflecting mitochondrial oxidation and extracellular acidification rate (ECAR), indicated as a parameter of glycolytic activity, were performed on a Seahorse XF96 Analyzer (Agilent Technologies, USA) based on previous descriptions [30–32].

Glioma cell lines were plated in 100 μ l complete DMEM growth media at 1.5×10^4 cells/well density onto 96-well Seahorse plates (Agilent Technologies, USA) 24 h prior to the assays. The medium was removed and was replaced by glucose-, glutamine- and pyruvate-free DMEM medium (D5030 pH 7.4). The basal OCR and ECAR were calculated via XF96 Analyzer software (Agilent Technologies, USA) after 1.5-h incubation at this condition.

Following this, substrate utilisation was measured by using different substrates in parallel wells.

During the measurements freshly prepared substrates (glucose 10 mM, glutamine 2.5 mM, citrate 5 mM, GABA 5 mM, lactate 5 mM, malate 10 mM, acetate 10 mM and glutamate 5 mM) and/or metabolic inhibitors/modulators (oligomycin 2 μ M, 2,4-dinitrophenol - DNP 100 μ M and antimycin A + rotenone 1–1 μ M) were injected into each well to reach the desired final working concentration.

LC-MS/MS method for quantitative metabolite analysis

Intra- or extracellular metabolites - citrate, aKG, succinate, fumarate, malate, glutamate, 2-HG - were extracted by a modified method based on Szoboszlai et al. [33, 34]. Cells (minimum 5×10^5 cells) were quenched in liquid nitrogen. Metabolites were extracted from cells and in parallel 300–500 μ l supernatant by methanol-chloroform-H₂O (9:1:1) and vortexed at 4 °C. After centrifugation (15,000 \times g, 10 min, 4 °C) the clear supernatants were stored at -80 °C until measurements. Citrate, aKG, succinate, fumarate, malate, glutamate and 2-HG concentrations were assessed by using calibration curves obtained with the dilution of analytical purity standards in the range of 0.5–50 μ M. LC-MS grade water, LC-MS grade methanol

and LC-MS grade formic acid were purchased from VWR International Ltd. (Debrecen, Hungary).

LC-MS/MS assays were performed on a Perkin-Elmer Flexar FX10 ultra-performance liquid chromatograph coupled with a Sciex 5500 QTRAP mass spectrometer. For chromatographic separation a Phenomenex Luna Omega C18 column, (100 × 2.1 mm, 1.6 μm) was used (GenLab Ltd., Budapest, Hungary). The mobile phase consisted of water containing 0.1% (v/v) formic acid (A) and methanol containing 0.1% (v/v) formic acid (B). The mass spectrometer was operating in negative electrospray ionisation mode with the following settings: source temperature: 300 °C ionisation voltage: – 4000 V, curtain gas: 35 psi, gas1: 35 psi, gas2: 35 psi, entrance potential: –10 V, CAD gas: medium. Quantitative analysis was performed in multiple reaction monitoring (MRM) mode.

Different substrate consumptions were analysed using ¹³C-labelling and LC-MS measurements

Sub-confluent cells were washed and incubated in DMEM D5030 medium with 10 mM D-U-¹³C-glucose or 4 mM L-U-¹³C-glutamine or 10 mM 2-¹³C-acetate (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA) addition for 1 h in short-time labelling experiments before the extraction [32]. In 24-h labelling experiments – avoiding long-term starvation/non-physiological conditions – cells were seeded in DMEM D5030 medium supplemented with FBS, and the combination of labelled and/or unlabelled glucose (10 mM) and glutamine (4 mM) or acetate (10 mM) were added to cell cultures for 24 h.

SSADH expression analysis by immunohistochemistry (tissue microarray) in clinical samples

47 glioma patients (type: astrocytoma *n* = 14, oligodendroglioma *n* = 14, glioblastoma *n* = 19; sex: female *n* = 23, male = 24; WHO grade: II *n* = 9, III *n* = 19, IV *n* = 19; IDH1 R132H mutation: positive *n* = 32, negative *n* = 15) were included in a tissue microarray (TMA) study. Three normal brain and renal tissues were included as controls. Expression studies by IHC on biopsy materials were approved by the Institutional Ethical Review Board (TUKÉB no. 7/2006). TMA sections were deparaffinised, endogenous peroxidase blocking was followed by antigen retrieval (sodium citrate; pH 6). Immunostaining was performed by routine diagnostic antibodies (such as anti-IDH1 R132H), SSADH (Abcam #129017 1:500) antibody and Novolink Polymer Detection System (Novocastra, Wetzlar, Germany), visualised by DAB and counterstained with haematoxylin. H-scores (scale of 0–300) were determined by two independent pathologists with semi quantitative analysis of immunoreactivity using 3DHistech Panoramic Viewer program according to Krenicz et al. [35]. The H-score was calculated from staining intensity (0, 1+, 2+, or 3+) and positively stained

tumour cells (percentage). The final H-score was calculated by averaging the H-scores of all the scores from the same tissue. SSADH expression was categorised as low (H-score 0–149) and high (H-score 150–300).

Statistical analysis

The data are presented as mean with standard deviation and calculated from three independent experiments with minimum three or more parallels depending on the method used. Results were statistically evaluated through one-way ANOVA with post-hoc Tukey's and Dunnett's tests for multiple comparisons by IBM SPSS Statistics software, version 22 (SPSS Inc.). Mann-Whitney U test and Kruskal-Wallis test were used to compare SSADH expressions and clinicopathologic parameters in human gliomas using IBM SPSS Statistics software, version 22 (SPSS Inc.). *p* < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Characteristics of cellular respiration and glycolytic activity in glioma cells

The basal oxygen consumption rates (OCR) among the investigated gliomas showed significant differences. The lowest respiration rate was observed in U87 MG, while the highest basal rate was produced by U373 MG cells in DMEM D5030 medium (Fig. 1a). In contrast with the respiratory parameters, there were no differences in the basal extracellular acidification (ECAR) rates. However, glucose addition reveals alteration in the metabolic adaptation of gliomas. Lactate productions using glucose administration with or without mitochondrial respiratory inhibitor were the highest in U87 MG cells, which have the lowest basal respiratory activity (Fig. 1b). These findings indicate an inverse relationship between the basal oxygen consumption and the glycolytic activity. Additionally, we compared the glutamine metabolising properties of the examined gliomas. The glutaminolysis-driven respiratory capacity was significantly higher in U251 wt cells than in U87 MG or U373 MG cells (Fig. 1c). Using same cell density, time-dependent growth showed individual differences in these glioma cells (Fig. 1d), but these did not correlate to their oxygen consumptions. U373 MG cells have the fastest proliferation and these cells have both high glucose utilisation and high respiratory capacity.

IDH1 mutation and related 2-HG accumulation increase the basal respiration and decrease the glycolytic capacity

The effects of the most frequent IDH1 mutation (R132H) of gliomas in energy metabolism and substrate consumption were studied in an IDH1 mutation (R132H) carrying glioma model (isogenic pair: U251 wt and its genetically engineered counterpart - U251 IDH1m). Besides, we studied the short-term effects of 2-HG incubation in U251 wt cells. Comparing the basal respiration of wt, 2-HG-treated

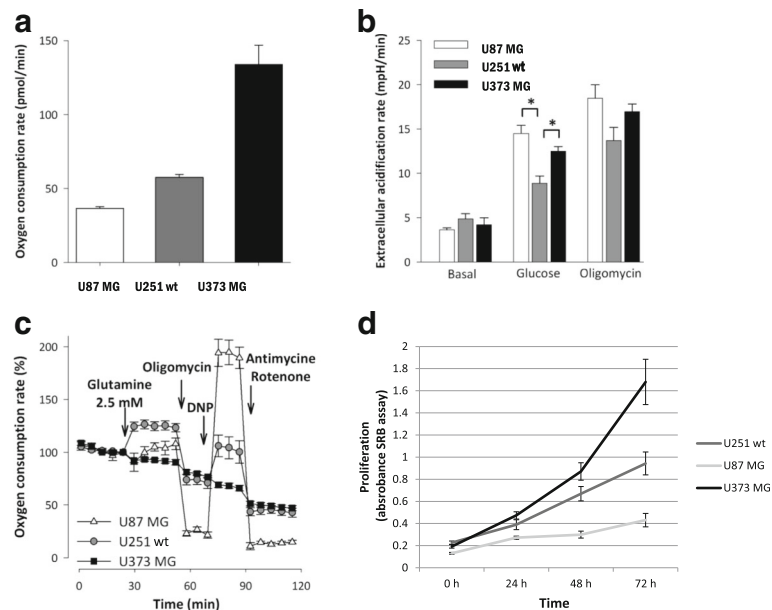


Fig. 1 Oxygen consumption, extracellular acidification rate and glutamine oxidation differences were measured by Seahorse in U87 MG, U251 wt, U373 MG glioma cell lines using D5030 medium. **a** Different oxygen consumption rates in the studied cell lines (pmol/min). **b** Extracellular acidification rates were measured in minimal medium (D5030) at basal rate and after glucose (10 mM) addition following oligomycin (2 μ M) treatment. **c** Oxygen consumption rate curves in minimal medium (D5030), and after glutamine (2.5 mM) addition and using several metabolic inhibitors and modulators (oligomycin - 2 μ M; 2,4-dinitrophenol - DNP - 100 μ M; antimycin - 1 μ M - and rotenone - 1 μ M) * p < 0.05. **d** Time-dependent growth of different glioma cell lines (U87 MG, U251 wt and U373 MG) at normal non-starving conditions. Cell proliferation was monitored by SRB test using 2.5×10^3 cells/100 μ l at the starting point of the experiments

wt and IDH1m U251 cells, significantly elevated OCR was observed in case of IDH1m and 2-HG-treated wt cells (Fig. 2a). In contrast, higher extracellular acidification rates – especially after glucose addition – were measured in U251 wt cells compared to IDH1m and 2-HG-treated U251 wt cells (Fig. 2b). These alterations were detected by Seahorse measurements, the altered characteristics related to IDH1 mutation and 2-HG treatment were supported by Western blot analyses of certain metabolic enzyme expressions in these models (Fig. 2c). Higher β -F1-ATPase expression was detected in IDH1m cells in parallel with increased OCR compared to wt cells. However, short-term 2-HG addition did not elevate the expression level of β -F1-ATPase in U251 wt cells. Analysing certain key enzymes of glycolysis (e.g. hexokinase 2, phosphofructokinase P), decrease in their expression was detected in IDH1m and 2-HG-treated wt cells.

U251 wt and IDH1m cells have significantly different in vitro growth characteristics. The proliferation of mutant cells was lower than of wild-type cells registered by cell number during culturing and SRB assay (doubling times were calculated based on Roth V. et al. – [36] – the doubling time of IDH1m cells was 1 h longer than wt by both cell counting and proliferation assay. However, 72-h (short-term) 2-HG treatment had no significant growing effect on cell proliferation rates in U251 wt cultures (Fig. 2d).

Intracellular metabolite concentration differences and the main source of 2-HG production

The intracellular metabolite concentrations (measured by LC-MS) confirmed the metabolic differences detected among U251 cell culture systems (Fig. 3a). High level of 2-HG was measured in IDH1m cells and similar 2-HG level was observed in 2-HG-treated wt cells by LC-MS (Fig. 3b). Moreover, elevated levels of TCA metabolites were observed in IDH1m and 2-HG-treated U251 wt cells (Fig. 3a). Inverse alterations were detected in glutamate concentrations. The amount of glutamate was decreased in IDH1m, but it was increased in 2-HG-treated wt cells comparing to wt cells (Fig. 3b).

To identify which substrates are the prominent sources for 2-HG production in IDH1-mutant U251 cells, the cells were fed with ^{13}C -labelled energy substrates (U- ^{13}C -glucose, U- ^{13}C -glutamine, 2- ^{13}C -acetate) in D5030 medium. Based on our 1-h-labelling results, both glutamine and glucose could be sources of 2-HG (5.5% ^{13}C -labelled 2-HG from glutamine and ~2% from glucose were detected). Performing 24-h-labelling experiments, glutamine was proven to be the main source of 2-HG – 87.43% (sum-total = M + n isotopomers) of the total intracellular 2-HG pool containing glutamine-derived ^{13}C -labelling (Fig. 3c), as compared to ^{13}C -incorporation percentages of 15.95 and 15.7% from glucose and acetate, respectively

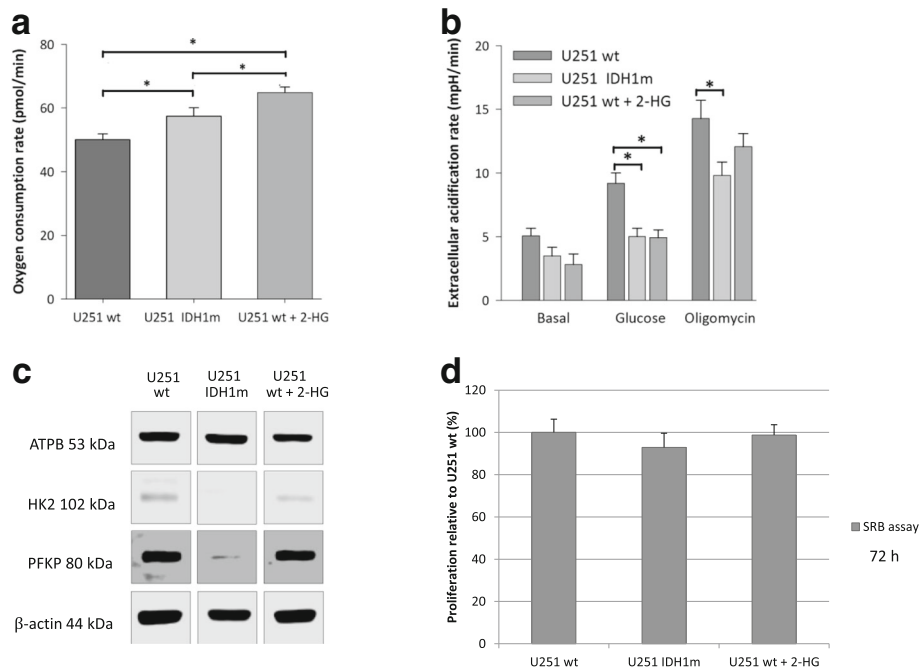


Fig. 2 IDH1 mutation (IDH1m) and the elevated 2-HG level related metabolic alterations in U251 glioma cells (oxygen consumption and metabolic enzyme expression differences). **a** Oxygen consumption rates in U251 wt, U251 IDH1m and 2-HG pre-treated (72 h, 4 mM) U251 wt cells (OCR was measured in D5030 medium by Seahorse). **b** Extracellular acidification data in minimal medium (D5030), and after glucose (10 mM) addition and using oligomycin (2 μ M) thereafter (Seahorse measurements). **c** Alterations in the expression of different metabolic enzymes in IDH1m and 2-HG-treated (72 h, 4 mM) U251 glioma cells (representative Western blot results using anti- β -F1-ATPase - ATPB, anti-hexokinase 2 - HK2, anti-phosphofruktokinase P - PFKP and β -actin). **d** Differences in proliferation of U251 wt, IDH1m and 2-HG pre-treated (72 h) wt cells. The relative proliferation was calculated related to U251 wt (100%), the growing capacity was monitored by SRB tests using 2.5×10^3 cells/100 μ l at the starting point of the experiments; * $p < 0.05$

(Fig. 3c). Labelling intensities of extracellular 2-HG levels correlated to and followed the intracellular ones in our measurements (Additional file 2: Figure S2).

IDH1 mutation and 2-HG related different substrate - including GABA - oxidation in U251 MG models

Beside glucose and glutamine, other substrates were also involved to study different substrate oxidations by Seahorse technique using wt, IDH1m and 2-HG-treated U251 wt cells. No differences between U251 wt and U251 IDH1m cells were detected with respect to lactate, citrate or acetate oxidations. In contrast, decreased oxidation of glutamine, glutamate and malate was measured in IDH1m cells (Fig. 4a). 2-HG-treated U251 wt cells mimicked IDH1m cells regarding oxidation (Fig. 4b). Enzyme expressions related to glutamine and acetate consumption were detected by Western blot (Fig. 4c).

Intriguingly, significant GABA oxidation was detected in U251 wt cells (OCR was elevated with 20%) (Fig. 4a). However, IDH1m cells did not oxidise GABA and this could be mimicked in 2-HG treated U251 wt cells (Fig. 4b). The pro- or anti-proliferative effects of short- and long-term GABA, 2-HG and GABA+ 2-HG combination treatments were also tested in U251 wt and IDH1m cells. Long-term

GABA treatment (for more than 3 weeks) significantly enhanced the proliferation of U251 wt cells, whereas significantly lower increase in proliferation was found in IDH1m cells (Fig. 4d). While 2-HG could not significantly reduce the proliferation of the long-term GABA treated IDH1m cells, 2-HG combination treatments reversed long-term GABA effects in the wild-type cells (Fig. 4d). Short-term (72 h) GABA, 2-HG treatments and their combination showed similar tendency in wild-type cells, however, no significant effect could be observed (data not shown).

According to the Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org>) database, U251 cells do not express GABA receptor subunit mRNAs (GABRA 1–6, GABRB1–3, GABRR1–3, GABRE and GABRQ), excluding receptor mediated effects of GABA. However, U251 cells do express SSADH and GAT1 proteins as shown by Western blot. Of note, SSADH and GAT1 protein level differences in IDH1m and 2-HG-treated U251 wt cells were also found (Fig. 4c). Noteworthy, U87 MG and U373 MG did not express SSADH. Accordingly, these cells did not oxidise GABA (Fig. 5a and b). To test the potential role of GABA shunt and SSADH activity in the survival and the proliferation of SSADH expressing U251 wt cells, we tested the effect of vigabatrin (GABA transaminase

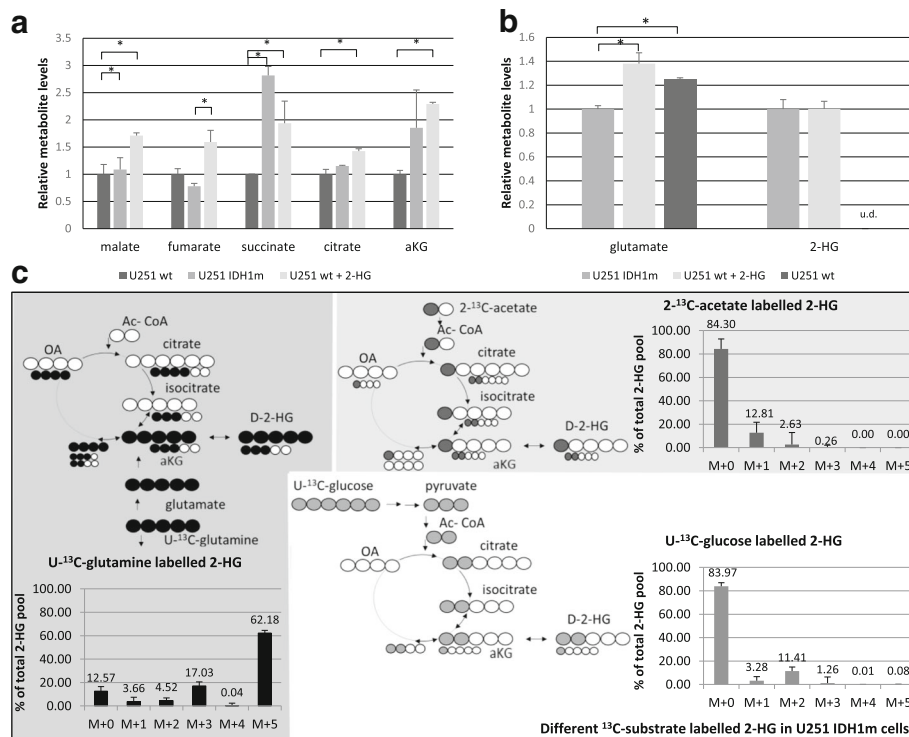


Fig. 3 Altered metabolite concentrations in IDH1-mutant and 2-HG-treated (72 h, 4 mM) U251 wt cells and the evaluation of the bioenergetic source of 2-HG production in U251 IDH1m cells (LC-MS measurements). **a** TCA cycle related metabolite levels (relative to wt) in IDH1m and 2-HG-treated U251 wt cells - (DMEM high glucose medium + 10% FBS + 2 mM L- glutamine). **b** Alterations in intracellular glutamate and 2-HG levels (relative to IDH1m) in 2-HG-treated U251 wt cells and in wt cells; u.d. = under detectable level - (DMEM high glucose medium 10% FBS + 2 mM L- glutamine). **c** Unlabelled and ¹³C-labelled intracellular 2-HG productions (% of total 2-HG pool) (24-h labelling period). To avoid starving condition, the medium was supplemented with 10% FBS and 10 mM D-glucose and/or 4 mM L-glutamine; 4 mM U-¹³C-glutamine labelling in D5030 + 10% FBS and 10 mM D-glucose; 10 mM U-¹³C-glucose labelling in D5030 + 10% FBS and 4 mM L-glutamine; or 10 mM 2-¹³C-acetate labelling in D5030 medium + 10% FBS + 10 mM D-glucose and 4 mM L-glutamine. Unlabelled 2-HG does not contain incorporated ¹³C atoms, M + 1/2/3/4/5 = mass number increased with 1/2/3/4 or 5 ¹³C atoms in 2-HG from different labellings; **p* < 0.05

inhibitor). Vigabatrin reduced the proliferation of glioma cells, as we could see this slight decrease in U251 wt cell cultures, as well. In U251 wt cells, vigabatrin could lower GABA oxidation, and in case of the presence of vigabatrin, GABA addition was not able to influence the cellular proliferation positively (Additional file 3: Figure S3). The exact role of SSADH in the detected GABA-dependent pro-proliferative effect needs examinations using specific SSADH inhibition in further studies.

SSADH overexpression in human glioma cases

In vitro cell lines do not necessarily reflect clinical tumours in all aspects [37]. Therefore, SSADH expression was studied in human glioma biopsies and peritumoural normal brain tissues (both cerebrum and cerebellum) by immunohistochemistry. In peritumoural cerebral tissues, high expression with H-score > 150 was observed in the cortical region, however, white matter astrocytes showed low to moderate expression (150 > H-score). In the cerebellum, moderate to high expression was observed in both the molecular and the granular cell layers similarly

to the Purkinje cells; we recorded that cells have low SSADH staining intensity (0/+) at non-tumoural areas. We could detect a moderate expression level in astrocytes of white matter in situ and 3+ positivity in glioma cells. Based on our results, SSADH protein level is higher in glioma cells than in normal tissues in almost all studied cases; therefore, we could not find any differences between IDH-mutant and wild-type cases at this level. In the glioma biopsies, high SSADH expression was characteristic for all histological subtypes (Fig. 5c). High SSADH expression was found in 97% of cases. This SSADH expression showed no associations with clinicopathological parameters such as age, gender, tumour type, grade or IDH mutation status.

Discussion

Our main aim was to characterise the bioenergetic differences related to IDH mutations by using an isogenic cell line pair with and without the IDH1 R132H mutation.

The effects of epigenetic and other (e.g. metabolic) alterations caused by IDH1 mutation have been described

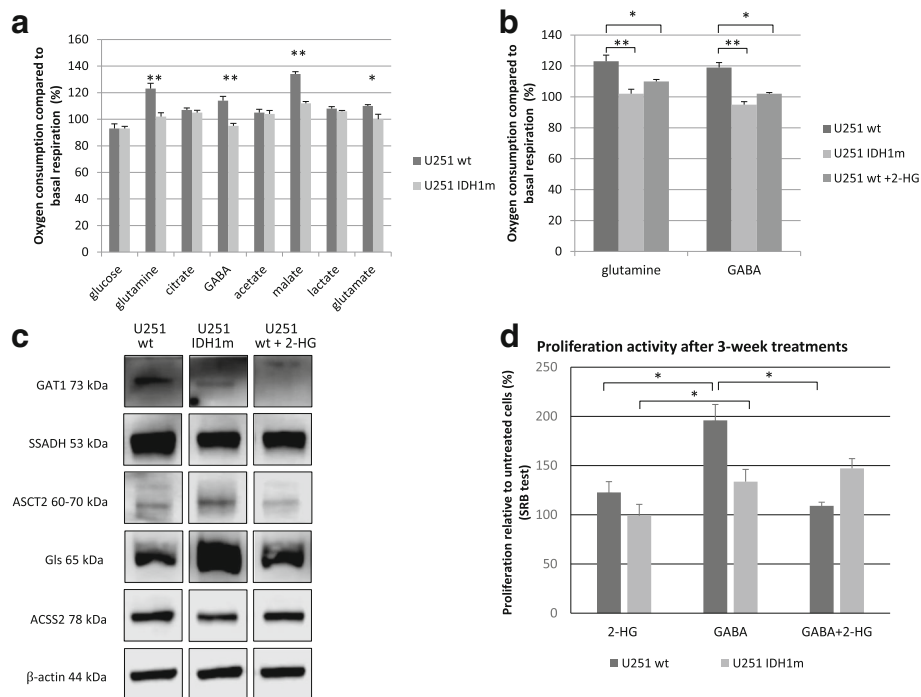


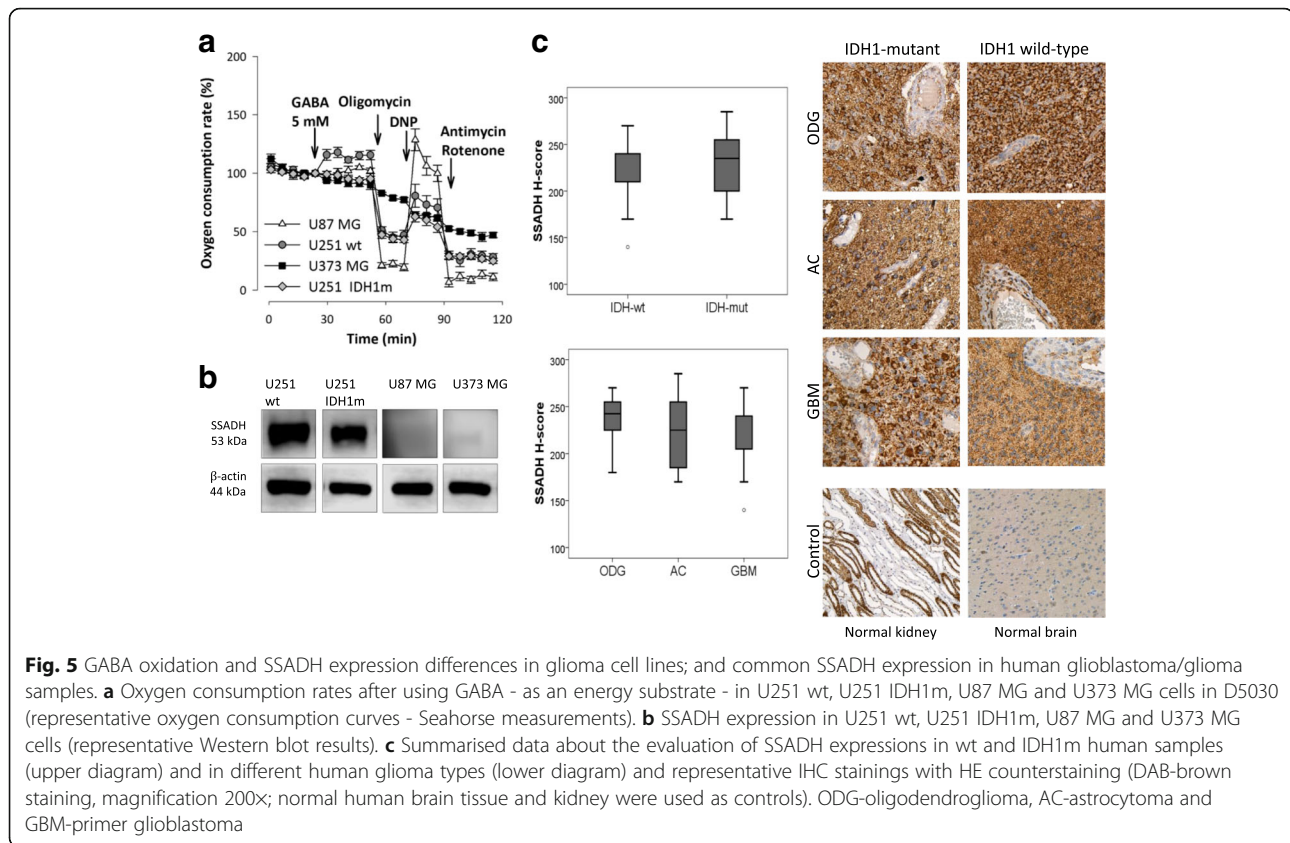
Fig. 4 Energy substrate oxidation differences in wt, IDH1m and 2-HG-treated U251 wt cells. **a** Oxygen consumption compared to basal respiration (%) after using different energy substrates: glucose (10 mM), glutamine (2.5 mM), citrate (5 mM), GABA (5 mM), acetate (10 mM), malate (10 mM), lactate (5 mM), glutamate (5 mM) in U251 wt and U251 IDH1m cell lines in D5030 medium by Seahorse measurements, * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$. **b** Effects of 2-HG on glutamine and GABA oxidation in U251 wt, IDH1m and 2-HG-treated wt cells (the oxidation was measured after with or without 2-HG (4 mM) pre-treatment (72 h) in D5030 by Seahorse measurements) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. **c** GABA metabolism related enzyme (GAT1 - GABA transporter 1; SSADH - succinic semialdehyde dehydrogenase) expressions; glutamine metabolism related enzyme expressions (glutaminase, ASCT2 - alanine, serine, cysteine-preferred transporter 2); and acetate consumption related ACSS2 (acetyl-CoA synthetase 2) enzyme expression in U251 wt, IDH1m and 2-HG (4 mM) treated cells (72 h) using Western blot analyses. **d** Different growing characteristics of U251 wt and U251 IDH1m cells using long-term (3-week-long) 2-HG (4 mM), GABA (5 mM) and combination treatments in DMEM high glucose. After 3-week long-term continuous treatment (intermittently passaging 2 or 3 times per week) 2.5×10^3 cells/100 μ l were plated for 72 h and terminated by SRB tests. Data show the average of relative proliferations (untreated U251 wt = 100%) * $p < 0.05$

previously [38–40]. However, few data are available about the bioenergetic consequences of IDH1 mutation and their role in growth and survival of tumour cells [25, 41].

Based on our Seahorse measurements (oxygen consumption and extracellular acidification), higher oxygen consumption is strongly correlated to mutant IDH1-produced 2-HG. In addition, after using 2-HG treatment in wild-type cell cultures, the respiration was increased to similar level as in IDH1-mutant cells. Alterations of intra- and extracellular 2-HG besides Krebs cycle metabolite levels were observed. These observations suggest the presence of metabolic compensatory mechanisms in these cells. Our results confirmed, that the Warburg phenotype is dominant in IDH1 wild-type cells, whereas IDH1-mutant cells prefer oxidative phosphorylation using substrates other than glucose. Khurshed et al. published that glycolytic enzyme mRNA expression levels are higher in IDH wild-type tumour tissues and the expression levels of TCA related enzymes are higher in IDH1-mutant human cases [20]. It was also described that mutant IDH1 enzyme was

correlated with high mitochondrial density and increased mitochondrial activity in oligodendroglioma cell line xenografts in vivo [41].

In our study, the significantly reduced glutamate level in IDH1-mutant cells could correlate to enhanced glutaminolytic pathway (glutamine-glutamate-aKG-2-HG axis). This was not observed in U251 wt cells after 2-HG incubation, suggesting that glutamatolysis in IDH1-mutant cells is related to the necessity to replenish aKG levels, rather than by 2-HG induced effects [16]. Previous spectrometric analyses have shown and highlighted that the most important source of 2-HG is glutamine, and only low labelling could derive from glucose due to limited glucose turnover [26]. Glutamine was the main source of 2-HG in our experiments using ^{13}C -labelled substrates in 1-h- and 24-h-labelling periods which is in line with previous report [23]. Glucose and acetate also contributed to 2-HG-labelling in 24-h ^{13}C -labelling experiments. This potential contribution of acetate substrate in significant 2-HG ^{13}C -labelling after 24 h was detected first in our experiments. Previous TCGA-based analyses



suggest that glucose and acetate are preferential substrates in IDH wild-type, rather than IDH-mutant gliomas [20]; therefore, the relative contribution of glucose and acetate in clinical IDH-mutant gliomas needs further investigations.

It has been shown in in silico studies that IDH1-mutant gliomas have significantly higher lactate dehydrogenase B expression comparing to wild-type tumours; and higher lactate oxidation was hypothesised in IDH1 mutation bearing cells [20]. In our observations, we could not detect significant differences in lactate and acetate oxidation between wild-type and IDH1-mutant glioma cells. However, our results show that glutamine, glutamate and GABA energy substrates could significantly increase oxygen consumption rate in IDH1 wild-type U251 glioma cells (approximately 20% increase in OCR), but not in their IDH1-mutant counterpart cells. These suggest that GABA and glutamine can have an important role in energy production through substrate oxidation preferentially in IDH1 wild-type gliomas.

Dependency on glutamine and/or glutamate of IDH-mutant gliomas has been reported previously [21, 23]. Our current study has demonstrated for the first time, that GABA oxidation (using GABA as an energy substrate) via the activity of SSADH can produce energy, explaining our finding the GABA stimulated proliferation of U251 wild-type cells. However, emerging data

about the exact mechanism of GABA receptor mediated pro-proliferative effects are still unclear and contradictory [42, 43]. The detected pro-proliferative effect was not the result of GABA-receptor stimulation [44] as U251 cells lack expression of these. Based on our results, 2-HG could reverse the effect of GABA on proliferation. In line with the absence of SSADH expression in U87 MG and U373 MG, these cell lines were not able to oxidise GABA. Recent publications highlight the importance of GABA shunt in primer and metastatic brain tumours. The heterogeneity in cell lines with respect to SSADH expression and GABA oxidation warrants further investigation towards GABA use in human glioma cases and in other tumours which may rely on the effect of GABA use [28, 29, 45, 46]. Our IHC studies reveal that both IDH-mutant and wild-type gliomas express high levels of SSADH in contrast to normal brain, suggesting certain role for GABA in growth and survival in clinical tumours. This correlates to data of Human Protein Atlas, where 90% of studied human gliomas showed moderate or high SSADH expression which indicates a significantly higher expression than normal brain tissue.

Related to these El-Habr and his co-workers have demonstrated that the accumulation of gamma-hydroxybutyrate (by-product of GABA in central nervous system) and the related SSADH downregulation contribute to a less aggressive

phenotype in glioblastoma cases. They found higher SSADH protein expression in glioma cells than in normal brain tissue. They also described that downregulation, lowered expression and inhibited function of SSADH (shRNA silencing and gamma-hydroxybutyrate – structurally shows similarities to aKG and 2-HG – treatment) correlated to lower proliferation capacity of glioma cells in vitro and in vivo [47]. Regarding to high-grade gliomas which showed lower SSADH expression at mRNA level in TCGA database, in our study (47 cases were analysed), we could not confirm this difference at protein level. Based on our and others' results, SSADH protein level is higher in almost all glioma cells than in normal tissues. These suggest that SSADH protein overexpression at tissue level could have special tumour cell survival and growth promoting effect in both IDH-mutant and wild-type cases. To clarify the role of GABA metabolism, SSADH expression and functions need further studies using both mRNA and protein expression studies with patient follow-up. In these studies, overall survival data evaluations and if it is possible some SSADH function related analyses should be performed.

Our findings suggest that 2-HG may contribute to a less aggressive phenotype through its inhibitory effect on GABA oxidation. The detected SSADH overexpression in human cases could support GABA metabolism through either GABA oxidation or alternative GABA consumptions. Regarding to our and others' results, GABA metabolism of gliomas might be a possible novel entry point for therapy, especially in glioma patients with poor prognosis and limited treating opportunities.

Conclusions

As discussed above, evaluating the dominant bioenergetic pathways, preferred substrates (such as glutamine or GABA) which can support tumour growth could help to understand metabolic reprogramming and adaptation facility better in glioma cells, and to seek new alternatives for targeted therapy in this incurable aggressive disease, respectively.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Simplified scheme of the examined bioenergetic pathways in the studied IDH1 wild-type and mutant glioma cells. In our study, different energy substrate oxidation and metabolic enzymes relating to the following bioenergetic pathways were analysed regarding the role of IDH1 mutation. Energy substrate oxidation: glucose, glutamine, citrate, GABA, acetate, malate, lactate and glutamine were measured by Seahorse technique. Energy metabolites - succinate, fumarate, malate, citrate, α -ketoglutarate, glutamate and 2-hydroxyglutarate were determined by liquid chromatography-mass spectrometry. Several protein expressions were measured by Western blot analysis or immunohistochemistry - Glycolysis: hexokinase 2 (HK2), phosphofructokinase P (PFKP), Glutaminolysis: alanine, serine, cysteine-preferring transporter 2 (ASCT2), glutaminase (Gls), GABA shunt: GABA transporter (GAT1), succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH), acetate consumption: acetyl-CoA synthetase 2 (ACSS2). Other

abbreviations can be found in the figure: GLUT1: glucose transporter 1, IDH: isocitrate dehydrogenase, LDH: lactate dehydrogenase, MCT1: monocarboxylate transporter 1, OAC: oxaloacetate, SSA: succinic semialdehyde. (PDF 348 kb)

Additional file 2: Figure S2. Extracellular 2-HG levels after ^{13}C -substrate labellings detected by LC-MS in U251 IDH1m cells. a, 2-HG pool after 24 h following ^{13}C -substrates incubation: 4 mM U- ^{13}C -glutamine labelled intra- and extracellular 2-HG. b, 10 mM U- ^{13}C -glucose labelled extracellular 2-HG in D5030. c, 10 mM 2- ^{13}C -acetate labelled 2-HG in D5030. Unlabelled 2-HG did not contain incorporated ^{13}C atoms, M + 1/2/3/4/5 = mass number increased with 1/2/3/4 or 5 ^{13}C atoms in 2-HG from different labellings (the low rate of M + 4 is not visible in the figure). The labelling conditions were given in the legends of Fig 3. (PDF 197 kb)

Additional file 3: Figure S3. Vigabatrin abolished the pro-proliferative effect of GABA a, The effect of GABA (5 mM), vigabatrin (0.6 mM) and GABA+vigabatrin on the proliferation of U251 wt glioma cells. SRB and Alamar Blue (AB) proliferation assays were used in 24-h treated cell cultures; b, Alterations in cell numbers (U251 wt cells) followed in every 4-day passage using 3-week continuous treatment, the average cell numbers were calculated from triplicates. (PDF 198 kb)

Abbreviations

2-HG: D-2-hydroxyglutarate; ACSS2: Acetyl-CoA synthetase 2; AML: Acute myeloid leukaemia; ASCT2: Alanine, serine, cysteine-preferring transporter 2; ATPB: β -F1-ATPase; FH: Fumarate hydratase; GABA: Gamma-aminobutyric acid; GAT1: GABA transporter 1; Gls: Glutaminase; HK2: Hexokinase 2; ICC: Intrahepatic cholangiocarcinoma; IDH: Isocitrate dehydrogenase; IDH1m: IDH1-mutant; PFKP: Phosphofructokinase P; SDH: Succinate dehydrogenase; SSADH: Succinic semialdehyde dehydrogenase; TCA: Tricarboxylic acid

Acknowledgements

We gratefully acknowledge to the clinicians (neurosurgeons, pathologists and oncologists) for their helpful work in the diagnosis and patients care and to Attila Patócs for the accessibility of LC-MS in his laboratory. The authors thank Géza Sáfrány who kindly provided U373 MG cell line in some experiments and László Kopper for his careful reading, helpful advice and discussion during the manuscript preparation. We are grateful to Gergely Sváb for his help in final Seahorse measurements and to Éva Mátrai Balogh, Anna Tamási and Mónika Szilágyiné Paulusz for their technical assistance in histological processing of human biopsies.

Funding

Our work was supported by Bolyai Fellowship Program of the Hungarian Academy of Sciences and STIA (Scientific and Innovative Research Fund of Semmelweis University) (A.S.) and Hungarian National Talent and National Excellence Programs (Z.H., I.K. and T.D.: supported by the ÚNKP-17-2/3 and ÚNKP-18-3 New National Excellence Program of the Ministry of Human Capacities); Z.H.'s research work was supported by Richter Centenarium Foundation Fellowship-2016. Recent research works at 1st Department of Pathology and Experimental Cancer Research were funded by NVKP_16-1-2016-0004 grant of the Hungarian National Research, Development and Innovation Office (NKFIH).

Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this manuscript. Further details are available on request.

Author's contributions

We declare that all authors have contributed significantly and all authors are in agreement with the content of the manuscript. Conception and design: ZH, AS. Development of methodology: ZH, GH, GP, IK, KM, NS. Acquisition of data (provided cell lines, provided facilities, etc.): WPJL, AJ, LT, AS. Analysis and interpretation of data (e.g. statistical analysis, biostatistics, computational analysis): ZH, GH, IK, TD, HR, WPJL, AS. Writing, review, and/or revision of the manuscript: ZH, AJ, WPJL, LT, AS. Administrative, technical, or material support (i.e. reporting or organising data, constructing databases): ZH, GP, IK, TD, KM. Study supervision: AS. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Ethics approval and consent to participate

The archived tissue samples were used with the approval of the Institutional Ethical Review Board (TUKÉB no. 7/2006).

Consent for publication

Not applicable.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹1st Department of Pathology and Experimental Cancer Research, Semmelweis University, Üllői út 26, Budapest 1085, Hungary. ²Department of Medical Biochemistry, MTA-SE Laboratory for Neurobiochemistry, Semmelweis University, Budapest 1444, Hungary. ³Hungarian Academy of Sciences - Momentum Hereditary Endocrine Tumours Research Group, Semmelweis University - National Bionics Program, Budapest 1088, Hungary. ⁴Laboratory of Environmental Chemistry and Bioanalytics, Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemistry, Eötvös Loránd University, Budapest 1518, Hungary. ⁵Department of Biochemistry, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands.

Received: 19 April 2018 Accepted: 26 October 2018

Published online: 07 November 2018

References

- Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, et al. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol.* 2009;118(4):469–74. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0561-9>.
- Yan H, Bigner DD, Velculescu V, Parsons DW. Mutant metabolic enzymes are at the origin of gliomas. *Cancer Res.* 2009;69(24):9157–9. <https://doi.org/10.1158/0008-5472>.
- Molenaar RJ, Maciejewski JP, Wilmink JW, van Noorden CJF. Wild-type and mutated IDH1/2 enzymes and therapy responses. *Oncogene* 2018. 2018; 37(15):1949–60. <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0077-z>.
- Dang L, Yen K, Attar EC. IDH mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics. *Ann Oncol.* 2016;27(4):599–608. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw013>.
- Miller JJ, Shih HA, Andronesi OC, Cahill DP. Isocitrate dehydrogenase-mutant glioma: evolving clinical and therapeutic implications. *Cancer.* 2017; 123(23):4535–46. <https://doi.org/10.1002/cncr.31039>.
- Bai H, Harmanci AS, Erson-Omay EZ, Li J, Coşkun S, Simon M, et al. Integrated genomic characterization of IDH1-mutant glioma malignant progression. *Nat Genet.* 2016;48(11):5966. <https://doi.org/10.1038/ng.3457>.
- Turkalp Z, Karamchandani J, Das S. IDH mutation in glioma: new insights and promises for the future. *JAMA Neurol.* 2014;71(10):1319–25. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.1205>.
- Dang L, Su SM. Isocitrate dehydrogenase mutation and (R)-2-Hydroxyglutarate: from basic discovery to therapeutics development. *Annu Rev Biochem.* 2017;86:305–31. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044732>.
- Waitkus MS, Diplas BH, Yan H. Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas. *Neuro-Oncology.* 2016;18(1):16–26. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov136>.
- Jalbert LE, Elkhaled A, Phillips JJ, Neill E, Williams A, Crane JC, et al. Metabolic profiling of IDH mutation and malignant progression in infiltrating glioma. *Sci Rep.* 2017;7:44792. <https://doi.org/10.1038/srep44792>.
- Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature.* 2009; 462(7274):739–44. <https://doi.org/10.1038/nature08617>.
- Strickland M, Stoll EA. Metabolic reprogramming in glioma. *Front Cell Dev Biol.* 2017;5:43. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00043>.
- Morin A, Letouzé E, Gimenez-Roqueplo AP, Favier J. Oncometabolites-driven tumorigenesis: from genetics to targeted therapy. *Int J Cancer.* 2014;135(10): 2237–48.
- Clark O, Yen K, Mellinghoff IK. Molecular Pathways: Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Cancer. *Clin Cancer Res.* 2016;22(8):1837–42.
- Nowicki S, Gottlieb E. Oncometabolites: tailoring our genes. *FEBS J.* 2015; 282(15):2796805. <https://doi.org/10.1111/febs.13295>.
- Salamanca-Cardona L, Shah H, Poot AJ, Correa FM, Di Galleonardo V, Lui H, et al. In Vivo Imaging of Glutamine Metabolism to the Oncometabolite 2-Hydroxyglutarate in IDH1/2 Mutant Tumors. *Cell Metab.* 2017;26(6):830–841. e3. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.10.001>.
- Zhu L, Ploessl K, Zhou R, Mankoff D, Kung HF. Metabolic imaging of glutamine in Cancer. *J Nucl Med.* 2017;58(4):533–7. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.182345>.
- Mashimo T, Pichumani K, Vemireddy V, Hatanpaa KJ, Singh DK, Sirasanagandla S, et al. Acetate is a bioenergetic substrate for human glioblastoma and brain metastases. *Cell.* 2014;159(7):1603–14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.025>.
- Comerford SA, Huang Z, Du X, Wang Y, Cai L, Witkiewicz AK, et al. Acetate dependence of tumors. *Cell.* 2014;159(7):1591–602. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.020>.
- Khurshed M, Molenaar RJ, Lenting K, Leenders WP, van Noorden CJF. 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.* 2017;8(30):49165–77. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17106>.
- van Lith SA, Navis AC, Verrijp K, Niclou SP, Bjerkvig R, Wesseling P, et al. Glutamate as chemotactic fuel for diffuse glioma cells: are they glutamate suckers? *Biochim Biophys Acta.* 2014;1846(1):66–74. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.04.004>.
- Maus A, Peters GJ. Glutamate and α -ketoglutarate: key players in glioma metabolism. *Amino Acids.* 2017;49(1):21–32. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2342-9>.
- Seltzer MJ, Bennett BD, Joshi AD, Gao P, Thomas AG, Ferraris DV, et al. Inhibition of glutaminase preferentially slows growth of glioma cells with mutant IDH1. *Cancer Res.* 2010;70(22):8981–7. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1666>.
- Sciacovelli M, Gonçalves E, Johnson TI, Zecchini VR, da Costa AS, Gaude E, et al. Fumarate is an epigenetic modifier that elicits epithelial-to-mesenchymal transition. *Nature.* 2016;537(7621):544–7. <https://doi.org/10.1038/nature19353>.
- Esmaili M, Hamans BC, Navis AC, van Horsen R, Bathen TF, Gribbestad IS, et al. IDH1 R132H mutation generates a distinct phospholipid metabolite profile in glioma. *Cancer Res.* 2014;74(17):4898–907. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0008>.
- Fack F, Tardito S, Hochart G, Oudin A, Zheng L, Fritah S, et al. Altered metabolic landscape in IDH-mutant gliomas affects phospholipid, energy, and oxidative stress pathways. *EMBO Mol Med.* 2017;9(12):1681–95. <https://doi.org/10.15252/emmm.201707729>.
- Schousboe A, Bak LK, Waagepetersen HS. Astrocytic Control of Biosynthesis and Turnover of the Neurotransmitters Glutamate and GABA. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:102. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00102>.
- Lenting K, Khurshed M, Peeters TH, van den Heuvel CNAM, van Lith SAM, de Bitter T, et al. Isocitrate dehydrogenase 1-mutated human gliomas depend on lactate and glutamate to alleviate metabolic stress. *FASEB J.* 2018;33: fj201800907RR. <https://doi.org/10.1096/fj.201800907RR>. [Epub ahead of print].
- Neman J, Termini J, Wilczynski S, Vaidehi N, Choy C, Kowolik CM, et al. Human breast cancer metastases to the brain display GABAergic properties in the neural niche. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(3):984–9.
- Jády AG, Nagy ÁM, Köhidi T, Ferenczi S, Tretter L, Madarász E. Differentiation dependent energy production and metabolite utilization: a comparative study on neural stem cells, neurons, and astrocytes. *Stem Cells Dev.* 2016; 25(13):995–1005. <https://doi.org/10.1089/scd.2015.0388>.
- Németh B, Doczi J, Csete D, Kacso G, Ravasz D, Adams D, et al. Abolition of mitochondrial substrate-level phosphorylation by itaconic acid produced by LPS-induced Irg1 expression in cells of murine macrophage lineage. *FASEB J.* 2016;30(1):286–300. <https://doi.org/10.1096/fj.15279398>.
- Nagy AM, Fekete R, Horvath G, Koncsos G, Kriston C, Sebastyen A, et al. Versatility of microglial bioenergetics machinery under starving conditions. *Biochim Biophys Acta.* 2018;1859(3):201–14. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.12.002>.
- Szoboszlai N, Guo X, Ozohanics O, Oláh J, Gömöry Á, Mihucz VG, et al. 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.* 2014;819:108–15. <https://doi.org/10.1016/j.jaca.2014.01.055>.

34. Hujber Z, Petővári G, Szoboszlai N, Dankó T, Nagy N, Kriston C, et al. Rapamycin (mTORC1 inhibitor) reduces the production of lactate and 2-hydroxyglutarate oncometabolites in IDH1 mutant fibrosarcoma cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017;36(1):74. <https://doi.org/10.1186/s13046-0170544-y>.
35. Krencz I, Sebestyén A, Fábán K, Márk Á, Moldvay J, Khoor A, et al. Expression of mTORC1/2-related proteins in primary and brain metastatic lung adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 2017;62:66–73. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2016.12.012>.
36. Roth V. 2006 Doubling Time Computing, Available from: <http://www.doubling-time.com/compute.php>
37. Lenting K, Verhaak R, ter Laan M, Wesseling P, Leenders W. Glioma: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 2017;133(2):263–82. <https://doi.org/10.1007/s00401017-1671-4>.
38. Mazor T, Chesnelong C, Pankov A, Jalbert LE, Hong C, Hayes J et al. Clonal expansion and epigenetic reprogramming following deletion or amplification of mutant IDH1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(40):10743–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708914114>.
39. Wong CC, Qian Y, Yu J. Interplay between epigenetics and metabolism in oncogenesis: mechanisms and therapeutic approaches. *Oncogene*. 2017; 36(24):3359–74. <https://doi.org/10.1038/ncr.2016.485>.
40. Jin Y, Elalaf H, Watanabe M, Tamaki S, Hinenno S, Matsunaga K, et al. Mutant IDH1 dysregulates the differentiation of mesenchymal stem cells in association with GeneSpecific histone modifications to cartilage- and bone-related genes. *PLoS One*. 2015;10(7):e0131998. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131998>.
41. Navis AC, Niclou SP, Fack F, Stieber D, van Lith S, Verrijp K, et al. 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*. 2013;1:18. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-1-18>.
42. Young SZ, Bordey A. GABA's control of stem and cancer cell proliferation in adult neural and peripheral niches. *Physiology (Bethesda)*. 2009;24:171–85. <https://doi.org/10.1152/physiol.00002.2009>.
43. Takehara A, Hosokawa M, Eguchi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Nakamura Y, Nakagawa H. Gamma-aminobutyric acid (GABA) stimulates pancreatic cancer growth through overexpressing GABAA receptor pi subunit. *Cancer Res*. 2007;67(20):9704–12.
44. Kuol N, Stojanovska L, Apostolopoulos V, Nurgali K. Role of the nervous system in cancer metastasis. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1):5. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0674-x>.
45. Knott EL, Miriyala S, Nam H, Panchatcharam M, Leidenheimer N. The role of the GABA shunt in prostate cancer metabolic reprogramming and aggressive. *Cancer Res*. 2018;78(13):5486. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2018-5486>.
46. Schnepf PM, Lee DD, Guldner IH, O'Tighearnaigh TK, Howe EN, Palakurthi B, Eckert KE, Toni TA, Ashfeld BL, Zhang S. GAD1 upregulation programs aggressive features of Cancer cell metabolism in the brain metastatic microenvironment. *Cancer Res*. 2017;77(11):2844–56.
47. El-Habr EA, Dubois LG, Burel-Vandenbos F, Bogeas A, Lipecka J, Turchi L, et al. A driver role for GABA metabolism in controlling stem and proliferative cell state through GHB production in glioma. *Acta Neuropathol*. 2017;133(4): 645–60. <https://doi.org/10.1007/s00401016-1659-5>.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

