

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

Doktori tézisek

Dr. Hujber Zoltán

Semmelweis Egyetem
Patológiai tudományok Doktori Iskola



Témavezető:

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

Hivatalos bírálók:

Dr. Komlósi Zsolt, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Péterfia Bálint, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Buzás Edit Irén, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Tóth Erika, Ph.D., osztályvezető főorvos

Dr. Tőkés Anna-Mária Ph.D., tudományos főmunkatárs

Budapest
2018

1. Bevezetés

A legújabb daganatbiológiai vizsgálatok a tumorsejtek megváltozott, a sejtek proliferációjához szükséges bioenergetikai háttérrel biztosító anyagcsere folyamatainak jelentőségét hangsúlyozzák a daganatok progressziójában és terápiás érzékenység változásaiban, illetve a daganatok kialakulásában is. Számos kísérleti és egyéb adat támasztja alá, hogy a különböző tumorsejtek a normál sejtektől eltérő anyagcsere jellegzetességekkel (metabolikus tulajdonságokkal, metabolikus profillal), tápanyagigénnyel és szubsztrát-hasznosító képességgel (pl. glikolízis, glutaminolízis, zsírsav oxidáció) rendelkeznek. Előbbiekkel párhuzamosan a daganatsejtekre jellemző a nagyfokú metabolikus alkalmazkodóképesség, ami hozzájárulhat a daganatsejtek hosszú távú, akár terápiás kezelés melletti túléléséhez, majd terjedéséhez, áttétképzéséhez. Fontos az előbbieket befolyásoló tényező a daganatszövet sokféle szempontú heterogenitása is. Ez nemcsak a felépítő sejtek sokféleségét (tumor- és normál sejtek – kötőszöveti vagy immunsejtek), akár genetikai sokféleségét (többféle tumorsejt klón) jelenti, hanem a különböző sejtek együttműködését, szimbiózisát, az adott mikroköznyezethez való alkalmazkodását is. A heterogenitás egyik tényezője a szövetet alkotó sejtek metabolikus heterogenitása és együttműködése, metabolikus szimbiózisa, ami segíti a tumorsejtek, a szövet alkalmazkodását és a terápiás szerekekkel szembeni rezisztencia kialakulását is. A metabolikus változás egyik specifikus jellegzetessége a daganatsejtek onkometabolit-termelése is. Az onkometabolitok nagy mennyiségben termelődő kis molekulák, melyek a malignus fenotípust számos ponton

támogathatják. A legismertebb onkometabolitok a szukcinát, fumarát vagy a D-2-hidroxioglutarát (2-HG) de a legújabb összefoglalók már a daganatsejtek által termelt tejsavat is onkometabolitnak tekintik.

A tumorsejtek anyagcseréjének szabályozásában genetikai és epigenetikai tényezők játszanak szerepet. A tumorigenikus változások (onkogén aktivációk vagy tumorszuppresszor inaktivációk, egyéb epigenetikai változások) a tumornövekedésben fontos szerepet játszó jelátviteli útvonalak változását eredményezik, és a növekedési szignál aktivitásának fenntartása mellett részt vesznek az anyagcsere-szabályozás átprogramozásában is. Az RTK-PI3K-mTOR tengely számos sejtfunkció szabályozásában vesz részt. Ennek egyik központi eleme az mTOR (mammalian target of rapamycin) kináz, amely két különböző komplex (C1 és C2) formájában lehet jelen a sejtekben. Utóbbiak a jelátviteli hálózat fontos szabályozó elemeiként szenzorai a sejtek energia- és tápanyagellátottságának, amelynek függvényében szabályozzák a sejtek túlélését, proliferációját, az új sejtek felépítéséhez szükséges építőelemek bioszintetikus vagy akár lebontó folyamatait.

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

2. Célkitűzés

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

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

3. Módszerek

Sejt- és szövettenyésztés – *in vitro* vizsgálatok

A vizsgálatokban használt humán sejtvonalakat leírásaiknak megfelelően tenyésztettük: HT-1080, fibrosarcoma; Oscort, osteosarcoma; MDA-MB231, BT-474, ZR-75.1 emlő carcinomák; HepG2, hepatocellularis carcinoma; U937 akut myeloid leukaemia; A-2058, melanoma; U251 MG, U87 MG, U373 MG és IDH1 R132H overexpresszáló U251 MG gliomák.

In vitro kísérleteinkben alkalmazott inhibitor kezelések: rapamycin mTORC1 gátló; PP242 mTORC1/C2 inhibitor; NVP-BEZ235 – kettős PI3K és mTORC1 és C2 inhibitor; BPTES, illetve Zaprinast glutaminolízis inhibitorok. Előbbiek mellett rövid- és hosszú távú (24, 72 óra és 3 hét) kezelésekben 2-HG-t és GABA-t (gamma-amino-vajsav) adtunk a tenyészetekhez. Standard kemoterápiás szerként a doxorubicint és temozolomidot használtuk.

A sejtek proliferációjának vizsgálatát Alamar blue teszttel végeztük, az apoptotikus sejtek %-át áramlási citométerrel határoztuk meg.

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

SCID egerek talpába a HT-1080 sejteket szubkután oltottuk. Továbboltás után a tapintható tumorok megjelenését követően kezdtük a kezeléseket. Rapamycint (3 mg/ttkg) heti három alkalommal három hétig *per os* adtuk. A kezelés ideje alatt a

tumorméret változást regisztráltuk és a végső tumortömeget is mértük.

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

47 humán glioma biopsziás mintából szöveti multiblokkokat (TMA) készítettünk. Eseteink megoszlása: astrocytoma n=14, oligodendroglioma n=14, glioblastoma n=19; nő n=23, férfi n=24; WHO grádus: II n=9, III n=19, IV n=19; IDH1 R132H mutáns n=32, vad n=15 szerint. Kontrollként normál humán agyszövet, illetve normál vese biopsziát használtunk.

Fehérje expressziós és mutációs vizsgálatok

Western blottal a kezelt sejtek esetében a p-mTOR, pS6, Rictor, Raptor, laktát-dehidrogenáz A (LDH-A), glutamináz, glükóz transzporter 1 (GLUT1), β -F₁-ATPáz, GAPDH, pan-Akt, p-(ser473)-Akt 1, foszfo-fruktokináz-P, hexokináz-2, glutamin transzporter (ASCT2), szukcinát szemialdehid-dehidrogenáz (SSADH) és GABA transzporter 1 expressziót határoztuk meg.

Immunhisztokémiai festéseket készítettünk a HT-1080 xenograft mintákon, ezekben a p-S6, a p-mTOR, a glutamináz és az LDH-A fehérjék mennyiségét; míg TMA glioma metszeteken az SSADH expresszióját vizsgáltuk.

Az IDH1 R132H mutációt immuncitokémiai festéssel igazoltuk.

Anyagcsere-folyamatok vizsgálatai

Szubsztrát oxidáció vizsgálata ^{14}C -jelzett acetát és glükóz tápanyaggal: A tumorsejteket szubsztrátszegény (glükóz-, glutamin- és acetátmentes) médiumba helyeztük, majd $1\text{-}^{14}\text{C}$ -glükóz vagy $1\text{-}^{14}\text{C}$ -acetát mellett tartottuk 1 órán át. Ezt követően meghatároztuk a sejtek által kilélegzett CO_2 radioaktivitását Geiger-Müller számlálóval.

Metabolitok mennyiségének meghatározása: A sejtekből, szövetekből extraháltuk a különböző metabolitokat, majd a glikolízis (laktát) és a citrátkör (citrát, szukcinát, malát) metabolitjait, valamint bizonyos onkometabolitokat (2-HG) mennyiségét folyadék kromatográfia-tömegspektrometriai (LC-MS) rendszer segítségével mértük. Kísérleteink során több (LC-MS) módszert is beállítottunk (pl. grafít oszlopos elválasztáson alapuló közvetlen mérés; származékképzést követő mérés, közvetlen, módosított C18-as oszlopos LC-MS mérés).

Szubsztrát hasznosítás vizsgálata ^{13}C stabil izotóp jelöléssel: A jelöléses vizsgálatokban $\text{U-}^{13}\text{C}$ -glükózt, illetve $\text{U-}^{13}\text{C}$ -glutamint vagy $2\text{-}^{13}\text{C}$ -acetát szubsztrátokat adtunk a tenyészetekhez DMEM D5030 tápfolyadékba keverve. Az inkubációs idők leteltével a metabolitfrakciót extraháltuk és LC-MS módszerrel vizsgáltuk a ^{13}C atomok beépülését a különböző metabolitokba.

Seahorse mérés: Az oxigénfogyasztási ráta (OCR) és extracelluláris acidifikációs ráta (ECAR) szimultán mérése Seahorse XF96 Analyzer készülékkel (Agilent Technologies) történt. Az OCR a mitokondriális aktivitással, az ECAR a sejtek glikolitikus tevékenységével arányos. Mértük glioma

sejtvonalakon a glükóz, a glutamin, a citrát, a GABA, a laktát, a malát, az acetát és a glutamát oxidáció mértékét.

Statisztikai analízis

Legalább három független mérés segítségével végeztük a különböző kísérleteket, melyek során átlagot és szórást számoltunk. Az *in vitro* és *in vivo* kezelések során kétmintás t-próbát és egyszempontos variancia-analízist (ANOVA) használtunk; a humán glioma biopsziás minták SSADH expresszióinak nem-parametrikus H-score eredményei és a klinikopatológiai paraméterek összefüggéseinek statisztikai analízisére Mann-Whitney U és Kruskal-Wallis tesztekkel történt. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0,05$ értéket tekintettük.

4. Eredmények

Bioenergetikai vizsgálatok *in vitro* sejtvonalakban

Tumor sejtvonalak ¹⁴C-glükóz és -acetát szubsztrát hasznosításának jellemzése

A vizsgált sejtvonalak nagyobb része a glükózt jelentősebb mértékben oxidálta, mint az acetátot, a glükózoxidáló képesség azonban egyedi különbségeket mutatott. Legjelentősebb eltérést az acetátoxidációban tapasztaltunk. A glükóz/acetátoxidáció hányadosban mutató, a sejtvonalakat jellemző különbségekért elsősorban a tumorsejtek eltérő acetát hasznosítása, az ezzel összefüggő mitokondriális funkciók eltérései állhatnak. A legnagyobb különbséget a két szubsztrát oxidációjának arányában a HT-1080 fibrosarcoma és a ZR-

75.1 emlőcarcinoma sejteknél tapasztaltuk, ezért részletes bioenergetikai összehasonlító vizsgálatokat végeztünk ebben a két sejtvonalban.

Bioenergetikai útvonalakban fontos enzimek, transzporterek expressziójának jellemzése

A glükóz/acetát oxidációs arányok vizsgálatát kiegészítettük a GAPDH – glikolitikus enzim és a β -F1-ATPáz – mitokondriális légzési lánc fehérje expressziójának meghatározásával. A kiegyensúlyozott mitokondriális funkciót és magasabb acetát hasznosító képességgel rendelkező ZR-75.1 sejtek magasabb β -F1-ATPáz expressziót mutattak, mint a HT-1080 sejtek. A két fehérje expressziójának aránya összefüggést mutatott a korábbi vizsgálatban tapasztalt glikolízis és oxidatív foszforiláció arányával.

Glükóz hasznosítás vizsgálata ^{13}C -jelölt glükózjelölést követő LC-MS méréssel

A HT-1080 fibrosarcoma sejtekben az U- ^{13}C -glükózból származó ^{13}C atomok elsősorban a laktátban és glükóz-6-foszfátban jelentek meg, a TCA intermedierekben ezzel ellentétben jóval kisebb mértékű jelölődést tapasztaltunk, mint a ZR-75.1 emlőcarcinoma sejtekben. Glükózból a malátba 2-3 ^{13}C atom beépülését figyeltük meg a HT-1080 sejtekben, míg a ZR-75.1 sejtekben 4 ^{13}C -et is. Ezek alapján a HT-1080 sejtek a glükózt a TCA ciklusban kevésbé hasznosítják, mint a ZR-75.1 sejtek. Előbbi különbség szemléltetésére, a glikolízis és az oxidatív foszforiláció arányának jellemzéséhez a sejtek intracelluláris ^{13}C -laktát/ ^{13}C -malát arányát adtuk meg, ami a

HT-1080 sejtekben 13,74, míg a ZR-75.1-ben 1,17 volt. Ez a HT-1080 sejtek jelentős glikolitikus eltolódását mutatja.

Citrátkör működésének vizsgálata ^{13}C -jelölt acetáttal

Az acetyl-KoA második szénatomja a citrátkörön keresztül épülhet be a citrátba, így a $2\text{-}^{13}\text{C}$ -acetát alkalmazásával a citrátköri metabolitokba beépülő acetátból származó ^{13}C atomok sorsát is nyomon követhetjük. Az adott idő alatt a beépülő és a citrátban vagy további TCA metabolitokban feldúsuló jelölések mennyisége és a jelölt metabolitok arányának emelkedése utalhat a TCA ciklus intenzív működésére. A sejteket $2\text{-}^{13}\text{C}$ -acetáttal jelöltük, majd meghatároztuk a jelöletlen (csak ^{12}C atomokat tartalmazó citrátot) és a ^{13}C -mal (akár többszörösen) jelölt intracelluláris citrát mennyiségét. HT-1080 fibrosarcoma sejtekben 1-2 beépülést figyeltünk meg, míg a ZR-75.1 emlőcarcinoma sejteknél a 6 ^{13}C -mal jelölt citrátot is detektáltunk. Ezek az eredmények alátámasztják a ZR-75.1 sejtek intenzív mitokondriális működését, illetve a HT-1080 sejtekben megfigyelt károsodott mitokondriális funkciókat.

Glükóz és acetát szubsztrát hatása az adenilát energiatöltésre

Kísérleteinkben glükóz és acetát jelenlétében és hiányában is vizsgáltuk az adenilát energiatöltést (AEC) a HT-1080 és a ZR-75.1 sejtvonalakban. Tápanyagdús médiumban tartott sejtekhez (AEC=0,75-0,85) viszonyítva DMEM D5030 médiumban csökkent értékeket mértünk, ami HT-1080 sejtekben még jelentősebben változott (0,38), mint ZR-75.1 sejtekben (0,54). Ilyen éhezés mellett a HT-1080 sejtekben a

hozzáadott glükóz, míg a ZR-75.1 sejtekben a hozzáadott acetát emelte a mért AEC értéket.

A vizsgált bioenergetikai útvonalak lehetséges szabályozóinak tanulmányozása

A HT-1080 és ZR-75.1 sejtek összehasonlításakor az energia-anyagcsere szabályozásában is kiemelt jelentőségű mTOR komplexek szerepét is tanulmányoztuk. A HT-1080 sejtekben magas p-mTOR, p-S6 és relatív alacsony Rictor expresszió volt kimutatható, ami az mTORC1 komplex mennyiségének és aktivitásának túlsúlyára/dominanciájára utal. A ZR-75.1 sejtekben magas p-mTOR, alacsony p-S6 és magas Rictor expresszió volt jellemző, ami magas mTORC2 aktivitással hozható összefüggésbe. A p-(ser473)-Akt mennyisége szignifikánsan magasabb volt a ZR-75.1 sejtekben, ami a már említett magas mTORC2 aktivitásra és az ezekben a sejtekben kimutatott jól funkcionáló citrátköri folyamatok összefüggésére utalhat.

2-hidroxiglutarát termelés és az mTOR aktivitás kapcsolata

HT-1080 tumorsejtek 2-hidroxiglutarát onkometabolit-termelése

A HT-1080 tumorsejtek metabolikus karakterizálása során megállapítottuk, hogy ez a sejtvonalt jelentős glikolitikus aktivitást és károsodott mitokondriális funkciókat mutat. A mitokondriális károsodást támasztják alá a HT-1080 sejtvonalt xenograftjának elektronmikroszkópos felvételei, ahol csökkent

számú és sérült morfológiájú mitokondriumok figyelhetők meg. Ezzel szemben a ZR-75.1 sejtek mintáiból készült elektronmikroszkópos felvételek a normál sejtekéhez hasonló, ép struktúrájú mitokondriumokat mutatnak. LC-MS metabolitkoncentrációk mérése során egy általunk eddig nem vizsgált anyag nagy intenzitású csúcsát fedeztük fel a HT-1080 fibrosarcoma sejtek kromatogramján. A csúcs háttérében a 2-HG onkometabolit intracelluláris felhalmozódása áll (~18 nmol/10⁶ sejt), amit a Sanger szekvenálással igazolt heterozygota IDH1 R132C missense, funkcionyeréses mutáció okozott. ¹³C-jelöléses kísérleteink alapján a 2-HG fő forrásának a glutamin bizonyult.

Rapamycin kezelés laktát és 2-HG onkometabolit-termelést gátló hatása HT-1080 fibrosarcoma sejtekben

In vitro alátámasztottuk a rapamycin időfüggő mTOR aktivitás és proliferáció gátló hatásait HT-1080 sejtekben. A rapamycin kezelés az intracelluláris laktát és 2-HG mennyiségét is szignifikánsan csökkentette. A rapamycin kezelés végén a sejteket U-¹³C-glükózzal, vagy U-¹³C-glutaminnal jelölve követtük a beépülő ¹³C szénatomokat, vizsgáltuk megjelenésüket a 2-HG-ban, illetve laktátban. U-¹³C-glükóz jelölést követően a jelöletlen laktát mennyisége közel 50%-ra csökkent, ¹³C-jelölt laktátot pedig nem tudtunk kimutatni a rapamycin kezelt sejtekben. U-¹³C-glutamin jelölést követően a rapamycin kezelt sejtekben a jelöletlen 2-HG mennyisége közel 75%-kal csökkent és a jelölt 2-HG szintje is szignifikáns csökkent. Megfigyeltük továbbá, hogy míg rövid jelölést követően is kimutatható az U-¹³C-glükóz jelölt C atomok megjelenése 2-HG-ban – és természetesen ennek mennyisége

is csökken rapamycin kezelés mellett – addig az U-¹³C-glutamin a laktátot nem jelöli vizsgálati körülményeink mellett.

mTORC1 aktivitás szerepének igazolása a 2-HG és laktát onkometabolitok termelésében in vitro és in vivo

A rapamycin kezelés LDH-A és glutamináz enzim expressziót gátló hatásait igazoltuk rapamycin kezelés után. Más mTOR inhibitor vegyületek hasonló hatását is kimutattuk. A PP242 a laktát, a 2-HG, valamint az LDH-A és a glutamináz expresszió csökkentésén kívül a proliferációt is jelentősen csökkentette.

HT-1080 xenograft modellben is szignifikánsan csökkentette a tumornövekedést a rapamycin kezelés. Vizsgálatunkban igazoltuk a tumorszövet laktát és 2-HG mennyiségének (LC-MS), illetve a glutamináz és az LDH-A expressziójának (IHC) *in vivo* csökkenését is Rapamune kezelést követően.

Glioma sejtvonalak bioenergetikai tulajdonságainak vizsgálata, az IDH1 vad és mutáns sejtvonalak összehasonlítása

Glioma sejtvonalak alaplégzésében, glikolitikus aktivitásában kimutatható különbségek

Glioma sejtvonalak (U251 MG, U87 MG, U373 MG) oxigénfogyasztását, extracelluláris savasodását vizsgáltuk. A legmagasabb alaplégzéssel az U373 MG sejtek rendelkeztek.

A glioma sejtek egyedi szubsztrátoxidációs és glikolitikus kapacitással rendelkeznek.

IDH1 vad és IDH1 mutáns U251 MG glioma sejtvonalpárok légzésének és glikolitikus tevékenységének összehasonlítása

U251 MG IDH1 vad típusú és annak IDH1 R132H mutáns fehérjét hordozó párját Seahorse méréssel összehasonlítva a mutáns glioma sejtek magasabb alaplégzéssel és csökkent extracelluláris acidifikációval rendelkeznek a vad sejtekhez képest. Az IDH1 vad típusú sejtek 2-HG kezelése következtében a sejtek légzése emelkedik, glikolízise csökken, közelítve az IDH1 mutációt hordozó sejtekéhez. Az említett változásokat a fehérje expressziós vizsgálataink is megerősítették.

A 2-hidroxiglutarát forrásának vizsgálata IDH1 mutáns gliomasejtekben

LC-MS méréssel igazoltuk az IDH1 mutáns sejtekben felhalmozódó 2-HG-ot. Az IDH1 mutáns sejtekben ^{13}C -jelölt szubsztrátokkal (U- ^{13}C -glutamin, U- ^{13}C -glükóz és 2- ^{13}C -acetát) vizsgáltuk a 2-HG forrását. Rövid távú (1 óras) jelölés után glükózból és glutaminból származó jelölt C atom beépülését tapasztaltuk a 2-HG-ba, eszerint forrás lehet a glükóz és a glutamin, az acetát azonban nem. Hosszú távú jelölés (24 óras) után egyértelműen igazoltuk, hogy a keletkező 2-HG fő forrása a glutamin (teljes 2-HG „pool” 88%-a jelölődött U- ^{13}C -glutamin szubsztrát adása után) és ez jól korrelál a mutáns sejtekben megemelkedő glutamináz és glutamin transzporter (ASCT2) mennyiségével is. 24 óras vizsgálatainkban azonban azt is kimutattuk, hogy a 2-HG származhat glükózból és acetátból is, csak jóval kisebb mértékben. U- ^{13}C -glükóz jelölés után a teljes 2-HG „pool” 15,95%-a, míg 2- ^{13}C - acetát jelölés után a teljes 2-HG „pool” 15,7%-a tartalmazott jelölést.

Különbségek a bioenergetikai szubsztrátok oxidációjában IDH1 vad és mutáns U251 MG glioma sejtekben

Az IDH1 mutáns sejtekben a glutamin, a glutamát, illetve a malát szignifikánsan alacsonyabb oxidációját figyeltük meg. A 2-HG kezelés csökkentette a vad típusú U251 sejtek - a mutáns sejtekben tapasztaltakhoz hasonlóan - az adott szubsztrátok oxidációját. Előbbiek mellett, GABA hozzáadása szignifikánsan, közel 20%-kal emelte a vad típusú U251 MG sejtek oxigénfogyasztását, míg IDH1 mutáns U251 MG sejtekben ez az emelkedés nem jelent meg. Azt is kimutattuk, hogy a vad típusú sejtek így jellemzett GABA oxidációs képességét a 2-HG kezelés szignifikánsan csökkenti. Párhuzamosan a GABA bioenergetikai hasznosításában, oxidációjában szerepet játszó szukcinát szemialdehid-dehidrogenáz enzim (SSADH) és GAT1 fehérje expresszióját igazoltuk az U251 MG glioma sejtekben.

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

A GABA proliferációt befolyásoló hatásait rövid (72 óra) és hosszú távú (3,5 hét) kísérletekben IDH1 vad típusú (wt) és IDH1 mutáns fehérjét overexpresszáló (IDH1m) U251 MG sejtvonal párban vizsgáltuk. 72 óra GABA kezelés eredményeként kismértékű proliferáció fokozó hatást figyeltünk meg, de ez nem volt szignifikáns. GABA, 2-HG, és GABA+2-HG hosszú távú kezelése után, a GABA szignifikánsan fokozta vad típusú U251 MG sejtek proliferációját. Ezt azonban a kombinált kezelésben a 2-HG jelentősen csökkentette a vad típusú U251 MG típusú

sejtekben. Érdekes azonban, hogy a GABA kezelés a hosszú távú vizsgálatainkban, kis mértékben ugyan, de fokozta az IDH1m sejtek proliferációját is.

SSADH expresszió vizsgálata humán biopsziás glioma mintákon

A humán glioma minták 97%-ában magas SSADH expressziót mutattuk ki IHC vizsgálatainkban. Ez a magas expresszió nem mutatott összefüggést a vizsgált klinikopatológiai paraméterekkel (kor, nem, tumor típusa, grádusa vagy IDH1 mutációs státusz). Az SSADH normális szöveti expressziója ettől eltért, a peritumorális cerebrum magas SSADH expresszióját figyeltük meg a kortikális régióban, míg a nem tumoros astrocyta sejtek alacsony vagy közepes mértékben expresszálták az SSADH fehérjét.

5. Következtetések

Sejtek bioenergetikai és mTOR aktivitásának jellemzése *in vitro*:

1. Az LC-MS technika alkalmas a sejtek intracelluláris metabolit koncentráció viszonyainak mérésére; U-¹³C-glükóz és a 2-¹³C-acetát jelölést követően pedig a jelölt szénatomok metabolitokban megjelenő számbeli és mennyiségi változásának, a daganatsejtek domináns anyagcsere útvonalainak jellemzésére.
 - a) A modellként vizsgált ZR-75.1 emlőcarcinoma sejtvonalat jelentős acetát hasznosító képesség és a TCA ciklus fokozott aktivitása;
 - b) míg a HT-1080 fibrosarcoma sejtvonalat a tejsavas glikolízis túlsúlya és a károsodott mitokondriális funkciók jellemzik.
2. A 2-HG onkometabolit-termelés forrása IDH1 mutáns HT-1080, illetve glioma sejtekben elsősorban a glutamin; de glioma sejtekben hosszabb távú jelölés alapján acetát is lehet 2-HG forrás, így támogathatja a tumorigenezist.
3. Az mTOR aktivitás összefüggést mutat a sejtek metabolikus aktivitásával és onkometabolit-termelésével.
 - a) A HT-1080 sejtek metabolikus jellegzetességei összefüggést mutatnak a heterozygota IDH1 mutáns genotípusával és az ezzel összefüggő 2-HG onkometabolit-termelésével és a sejtek magas mTORC1 aktivitásával.
 - b) A ZR-75.1 sejteket a kiegyensúlyozott glikolitikus és mitokondriális anyagcsere-folyamatok mellett, a magas mTORC2 komplex aktivitás jellemzi.

- c) A HT-1080 sejtekben az mTORC1 inhibitor, rapamycin, proliferáció gátló hatásai mellett, az onkometabolitok termelését is csökkenti *in vitro* és *in vivo*.
- 4. A 2-HG és laktát termelés mTORC1 és ezzel összefüggésben glutamináz illetve LDH-A aktivitás függő.

Gliomák IDH1 mutációval összefüggő anyagcsere-változásainak bioenergetikai vizsgálata:

- 1. A glioma sejtek egyedi szubsztrátoxidációs és glikolitikus kapacitással rendelkeznek
 - a) A nem IDH mutáns glioma sejtvonalak alap oxidációs és glikolitikus funkciói egyedi eltéréseket mutatnak;
 - b) Az IDH1 mutáns glioma sejtvonal magasabb oxigénfogyasztással és alacsonyabb glikolitikus kapacitással rendelkezik, mint originális vad típusú párja;
 - c) Az SSADH expressziót mutató IDH vad típusú glioma sejtvonal a GABA bioenergetikai hasznosítására, oxidációjára képes, míg az IDH1 mutáns párja nem; a GABA kezelés fokozza a sejtek *in vitro* proliferációját;
 - d) a 2-HG, illetve az IDH1 mutációval összefüggő 2-HG termelés gátolja a GABA oxidációt és a GABA proliferációt fokozó hatásait.
- 2. Az általunk vizsgált humán glioma minták több mint 90 %-át IDH1 mutációs státusztól, nemtől és kortól független magas SSADH fehérje expresszió jellemzi, ami a GABA lehetséges bioenergetikai hasznosítására utal.

6. Saját publikációk jegyzéke

A tézisek alapjául szolgáló publikációk:

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

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

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

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

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

A tézisek témájához szorosan nem kapcsolódó közlemények:

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

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

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