



Univerzita Karlova v Praze

1. Lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce

Mitochondrie jako cíl protinádorové terapie

Mgr. Aleš Dvořák

Praha 2017

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Obor: Biochemie a patobiochemie

Předseda oborové rady:

Školící pracoviště: Fyziologický ústav AV ČR v.v.i.

Autor:

Mgr. Aleš Dvořák

Školitel:

RNDr. Petr Ježek, DrSc.

Oponenti:

.....
.....
.....

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne: v hod.

kde

S disertací je možno se seznámit na děkanátě

1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze

Abstrakt

Mitochondriální isocitrát dehydrogenáza 2 (IDH2) katalyzuje reduktivní karboxylaci (RK, reverzní dráhu Krebsova cyklu) a syntézu 2-hydroxyglutarátu (2HG).

RK se podílí na proliferaci nádorových buněk ve stížených podmínkách (hypoxie). Ve zkráceném Krebsově cyklu vytváří reverzní reakci z 2-oxoglutarátu (2-OG) citrát, který může být exportován do cytosolu, kde slouží jako prekurzor mastných kyselin a dalších molekul. Zároveň IDH2 při RK spotřebovává (stejně tak i při syntéze 2HG) NADPH. RK se tak z hlediska výzkumu zdá ještě zajímavější, neboť může ovlivnit produkci ROS a míru oxidačního stresu.

2HG může být syntetizován (krom mitochondrie) také v cytosolu, a v obou kompartmentech se na jeho syntéze podílí (mimo IDH2 a IDH1) i několik dalších enzymů. 2HG je významnou regulační molekulou a v současné době je využíván v diagnostice jako marker akutní myeloidní leukémie. Bývá označován jako možný inhibitor α -ketoglutarát-dependentních dioxygenáz (2OG-DD), jež se podílejí na různých epigenetických změnách a zvyšují malignitu rakovinného fenotypu spojenou se změnou proliferace.

V této práci byl pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí zkoumán význam RK a syntézy 2HG v buněčných liniích karcinomu prsu a v dalších buňkách, včetně primárních potkaních fibroblastů (F3).

U linií prsního karcinomu byla RK závislá na koncentraci O_2 , CO_2 a aktivitě respirace. Významnou anaplerotickou dráhou RK byla glutaminolýza.

Výsledky také demonstrují, že 2HG je syntetizován i v nenádorových buňkách, a navíc že ve zdravých buňkách změny jeho fyziologických hladin ovlivňují proliferaci. IDH2 se tak celkově jeví jako vhodný cíl protinádorové terapie, zejména ve světle nedávných objevů, ve kterých se ukázalo, že mutovaná i nemutovaná IDH2 katalyzuje ve velké míře syntézu 2HG z α -ketoglutarátu.

Klíčová slova: IDH2, Reduktivní karboxylace, 2-hydroxyglutarát, GC-MS, buňky prsního karcinomu HTB-126, fibroblasty, 2HG/2OG poměr, ^{13}C izotopické značení, proliferace fibroblastů, hypoxie

Abstract

Mitochondrial isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) catalyzes reductive carboxylation (RC, reverse Krebs cycle pathway) and 2HG synthesis (2HG) – metabolite of which many scientists are interested. 2HG may be concurrently synthesized in cytosol by IDH1.

RC is involved in anabolic reactions necessary for cell proliferation - produces citrate, fatty acid precursor – especially in hypoxia.

IDH2 and IDH1 are not the only enzymes that are involved in 2HG synthesis. Recently, several enzymes, which participate in 2HG production, have been discovered.

2HG is useful in cancer diagnostics due to its overproduction by transformed cells. Moreover, 2HG may cause epigenetic changes via inhibition of 2-oxoglutarate dependent dioxygenase.

In this work, the importance of RC and 2HG synthesis in cancer and healthy cells was investigated by gas chromatography with mass spectrometry detection as well as IDH2 influence.

We found that IDH2 significantly participates in reverse RC and 2HG synthesis in breast cancer cell lines and uses glutaminolysis as a supplementary anaplerotic pathway. RC is increased by hypoxia, inhibition of respiration, and decreased by activation of respiration or hypocapnia.

We confirmed 2HG synthesis and RC in healthy cells (fibroblasts, breast epithelial cells etc.) as well as in cancer cells. Interestingly, we observed changes of physiological 2HG levels in healthy cells which correlated with proliferation (This effect was not so obvious in cancer cells.).

It seems that IDH2 could be suitable target of anticancer therapy.

Key words: IDH2, Reductive carboxylation, 2-hydroxyglutarate, GC-MS, HTB-126 breast cancer cells, fibroblasts, 2HG/2OG ratio, ^{13}C isotopic labelling, proliferation of fibroblasts, hypoxia

Obsah

1	Úvod	5
1.1	Metabolismus nádorových buněk	5
	Glykolýza	5
	Mitochondriální metabolismus	5
	Glutaminolýza	6
	Isocitrátdehydrogenáza	7
	Reduktivní karboxylace nádorových buněk	8
2	Cíle práce	11
3	Materiál a metody	11
3.1	Tkáňové kultury	11
3.2	Silencing isocitrátdehydrogenázy 1 & 2	12
3.3	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí	12
	Preanalytická fáze	13
	Analytická fáze získání metabolitů	14
	GC-MS měření	14
	Postanalytická fáze – vyhodnocení výsledků	15
3.4	Izolace orgánů z potkanů	17
3.5	Získání a zpracování krve a moči pacientek s karcinomem prsu a zdravých kontrol	17
3.6	Analýza Western Blot	18
3.7	Průtoková cytometrie (FACS)	18
	Buněčný cyklus	18
	3.7.1 Měření produkce superoxidu	19
3.8	Metoda pro stanovení míry proliferace pomocí bromodeoxyuridinu	19
4	Výsledky	20
4.1	Buňky prsního karcinomu	20
	Citrát a malát jako marker reduktivní karboxylace	20
	Syntéza 2-hydroxyglutarátu	21
	Vliv inhibitorů respirace na reduktivní karboxylaci	22
	Vliv galaktózového média na reduktivní karboxylaci	22
	Změny reduktivní karboxylace při odlišné koncentraci CO ₂	22
	Silencing isocitrátdehydrogenázy 1	22
4.2	Reduktivní karboxylace v dalších buněčných liniích	23
	Význam 2-hydroxyglutarátu v nenádorových buňkách	23
5	Diskuze	27
6	Závěr	34
7	Reference	35

1 Úvod

1.1 Metabolismus nádorových buněk

Vůbec první, kdo poukázal na metabolické rozdíly mezi zdravými a nádorovými buňkami byl roku 1924 německý vědec Otto Warburg, který tvrdil, že nádorové buňky mají natolik nefunkční mitochondrie, že u nich probíhá zvýšená glykolýza a tvorba laktátu dokonce i za aerobních podmínek (1). Pojem „Warburgův efekt“ či „aerobní glykolýza“ vstoupil téměř okamžitě v platnost, což bylo roku 1931 korunováno Nobelovou cenou pro Otto Warburga¹. Aerobní glykolýza byla opakovaně potvrzena jako fenotypový projev, ale už několik let poté byl Warburgův objev aktualizován. Ukázalo se, že i nádorové buňky mohou v případě nedostatku glukózy zapojit do své bioenergetiky oxidativní fosforylaci (OXPHOS), a dokonce, že je pro progresi tumoru nedílnou součástí (2). V této teorii se vycházelo z pozorování Herberta G. Crabtree, který pozoroval tento jev původně na kvasinkách (3). V 50. letech 20. století pak došlo k revizi Warburgova článku (4), který zároveň odstartoval boom zabývající se metabolismem nádorových buněk (5, 6, 7, 8).

V současné době se výzkumem rakoviny zabývá velké množství vědeckých skupin, které jsou za jedno v tom, že metabolismus nádorových buněk funguje na principu tzv. metabolického remodelingu, kde jsou veškeré metabolické dráhy v transformované buňce využity pro tvorbu energie, stavebních jednotek a intermediátů potřebných k proliferaci buněk (7). Obecně se mezi modifikované dráhy v nádorových buňkách řadí glykolýza, Krebsův cyklus, pyruvátový cyklus (karboxylace pyruvátu), lipogeneze a pentózo-fosfátový cyklus (8).

Glykolýza

Aerobní glykolýza je považována za významný alternativní zdroj ATP (9), který kompenzuje poškození respiračního řetězce transformovaných buněk (10). Ovšem kromě nádorových buněk, které produkují prokazatelně vyšší množství laktátu (6, 11, 12), je fenotyp aerobní glykolýzy známý i u zdravých, rychle se dělících buněk, např. u kmenových buněk (12) nebo Sertoliho buněk (13). Dle energetické bilance (2x ATP při glykolýze vs. 36 – 38x ATP při OXPHOS) by se paradoxně mohlo zdát, že glykolýza je málo efektivní a slabý zdroj energie, ale faktem je, že může probíhat řádově až 100x rychleji (1). Dokáže pokrýt energetické potřeby rakovinných buněk, a to i v přechodné či trvalé hypoxii, kdy je prakticky jediným zdrojem ATP (14).

Rychle proliferující nádorové buňky se zvýšenou expresí konkrétních genů adaptují na potřebu zvýšené glykolýzy, respektive ATP (15). S up-regulovanou glykolýzou tedy souvisí zvýšená exprese specifických glukózových (GLUTs) a laktátových (MCTs) transporterů a současně i glykolytických enzymů (14). Díky řadě publikací na toto téma lze aerobní glykolýzu nádorových buněk zobecnit:

Mitochondriální metabolismus

Výzkum mitochondrií sahá až do devadesátých let 19. století, kdy byly v buňkách vůbec poprvé objeveny (1). Jejich stáří se odhaduje na 1,8 miliard let (16).

Mitochondrie jsou specifické, semiautonomní organely, které hrají důležitou roli v oxidačním metabolismu glukózy, mastných kyselin a dalších uhlovodíků, jež jsou katabolicky přeměněny na acetyl-CoA reagující s oxalacetátem v osmistupňovém Krebsově cyklu za vzniku citrátu a dalších meziproductů, GTP a redukčních ekvivalentů (NADH, FADH₂), potřebných pro tvorbu ATP pomocí dýchacího řetězce a OXPHOS (1).

Význam pro nádorové buňky spočívá hlavně v syntéze substrátů a prekurzorů dalších látek, jako jsou například lipidy, puriny, pyrimidiny, aminokyseliny a v neposlední řadě i ATP.

¹ (http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1931/warburg-bio.html)

1.1.1.1 Krebsův cyklus

Významným milníkem, zcela zásadním pro pochopení buněčného metabolismu spojeného s mitochondriemi, byl objev z 30. let 20. století (1937), dnes známý jako Krebsův, neboli citrátový cyklus.

Několik enzymů Krebsova cyklu je spojeno s tumorigenezí, konkrétně sukcinátdehydrogenáza (SDH), fumarát hydratáza (FH) a isocitrátdehydrogenáza (IDH) (17).

Mutace SDH a FH byly nalezeny u dědičných nádorových onemocnění a způsobují hromadění sukcinátu, respektive fumarátu, což způsobuje inhibici prolyl hydroxyláz (PHD) zodpovědných za degradaci HIF1 α . Tím dojde například u lidských embryonálních buněk (HEK293) k pseudohypoxické odpovědi a následnému zvýšení glykolýzy, což zvýhodňuje tumorigenezi (18, 19).

IDH existuje ve třech izoformách, běžně označovaných IDH1, IDH2 a IDH3, přičemž IDH2 kromě reverzní redukční karboxylace (RK), reakce 2OG zpět na isocitrát, katalyzuje ještě syntézu 2-hydroxyglutarátu (2HG) – významného onkometabolitu a diagnostického markeru.

Glutaminolýza

Glutamin (Gln) je z hlediska metabolismu buněk významná a hlavně nejrozšířenější aminokyselina, z které je anapleroticky syntetizován α -ketoglutarát (2OG). Dále se Gln podílí na detoxikaci amoniaku močovinným cyklem (podílí se na regulaci), slouží jako prekurzor pro tvorbu dalších aminokyselin, glutathionu a proteinů, a také je potřebný pro produkci pyrimidinů (20, 21).

Přeměna glutaminu na 2OG probíhá dvoustupňovou deaminací, na které se podílí nejprve glutamináza (GLS) přeměňující glutamin na glutamát a následně glutamát dehydrogenáza (GDH) produkující 2OG. GDH může být zastoupena transaminační reakcí, katalyzovanou glutamát-pyruvát nebo glutamát-oxalacetát transaminázou (22). Význam této anaplerotické dráhy spočívá v její schopnosti doplnit Krebsův cyklus o meziprodukty, které jsou odčerpávány a úzce spjaty i s produkcí ATP (23). Tento jev byl pozorován nejen v pracujícím svalu, enterocytech, retikulocytech a lymfocytech (23), potkaních fibroblastech (24), ale především u mnoha nádorových buněk (např. HeLa, HTB-126, a mnoho dalších), které mají díky rychlé proliferaci zvýšené nároky na syntézu ATP (25, 26 – 29).

Význam p53 při glutaminolýze spočívá v jeho ovlivnění GLS. Existují dvě fosforylační aktivované izoformy GLS: GLS1 a GLS2 (30). GLS1 se podílí na buněčné proliferaci, zatímco GLS2 bývá obvykle spojována s nedělicími se buňkami. GLS2 bývá indukována pomocí p53 jako odpověď na ROS a její zvýšená exprese vede k redukci růstu nádorových buněk (31). Nedávno se ovšem objevily důkazy o tom, že v buňkách jaterního karcinomu, ve kterých je inhibována GLS2 chemickými působky (přesto, že je její hladina celkově nižší), dochází k významnému snížení proliferace, způsobené inhibicí mTORC1 (32).

Vyšší fosforylace p53 a apoptóza v DMBA (7,12-dimethylbenz[a]anthracen) indukovaném prsním karcinomu po perorální suplementaci glutaminem naznačuje vliv glutaminolýzy na aktivitu p53 (33, 34). Tato zvýšená tumor supresivní aktivita p53 je spojena i s vyšší expresí cílů p53: p21^{Waf1/Cip1}, PTEN, mdm2 a IGF-IR, což ve spojení s dodáním glutaminu může vést k vyšší citlivosti na chemoterapii (35). Tyto poznatky tedy podporují předchozí hypotézu, kde indukce GLS2 koreluje s aktivitou p53, což se ve výsledku projeví sníženou proliferací.

Na druhou stranu, p53 je potřebný pro přežití nádorových buněk v nízkých koncentracích glutaminu, tedy pro adaptaci buněk na jeho nedostatek. Je zatím doloženo, že v tomto mechanismu hraje významnou roli fosfatáza 2A (dráha B55 α -EDD-p53), která aktivuje p53 (36, 37).

Za jakýsi protipól p53 by se dal považovat Myc (c-Myc), transkripční faktor, který bývá obvykle deregulován v nádorových buňkách. Ve zdravých buňkách je považován za proto-onkogen, který napomáhá buněčnému růstu a proliferaci (38, 39). Jeho aktivita bývá obvykle také regulována buněčnými signály, souvisejícími s buněčným cyklem, a rovněž i externími signály. V nedělicích se buňkách je Myc málo, ovšem jakmile se začnou buňky dělit, dojde k signifikantnímu navýšení jeho hladiny (40), která indukuje závislost nádorových buněk na glutaminu, k čemuž významně přispívá právě transformace tohoto proto-onkogenu. V souvislosti s tímto jevem se uvádí, že množství Gln, který je využíván Krebsovým cyklem převyšuje množství, které je využito pro syntézu dalších

aminokyselin a nukleotidů (21, 41, 42). Abnormální regulace Myc tedy vede k nekontrolované proliferaci a nedostatečné apoptóze (43).

Myc tedy reguluje glykolýzu i glutaminolýzu a v současné době se ukazuje i jako zprostředkovatel akumulace onkometabolitu 2HG (44).

Za významné regulační proteiny jsou považovány i sirtuiny (SIRTs). Sedmičlenná rodina těchto proteinů, označovaných obvykle SIRT 1-7, zprostředkovává převážně deacetylační reakce, a podílí se na řadě konkrétních regulačních mechanismů (25). SIRT 3, 4, 5 jsou výhradně mitochondriální (25). V případě glutaminolýzy hraje významnou roli SIRT3 a 4, jejichž působením se inhibuje aktivita GDH (45, 46).

SIRT3 může také aktivovat IDH2, která může katalyzovat stejnou reakci jako IDH3, tedy přeměnu isocitrátu na 2OG za současné produkce NADPH. Tento jev se objevuje často ve spojení s výzkumem vlivu kalorické restrikce a má za následek u WT myši zvýšenou produkci NADPH a tím pádem i zvýšenou antioxidační kapacitu mitochondrií. SIRT3-deficientní myši tento efekt postrádají a dochází u nich mnohem dříve například k hluchotě.

Další nezanedbatelný význam glutaminu spočívá v jeho podílu na buněčné signalizaci. Durán a kol. prokázali, že glutaminolýza aktivuje mTOR (mammalian target of rapamycin), a tím potlačuje autofagii buněk a zároveň podporuje jejich růst a proliferaci (47).

TOR je serine/threonine kináza, která reguluje buněčný růst, metabolismus a stárnutí (48, 49). Tvoří dva strukturálně a funkčně odlišné komplexy, nazvané TORC1 a TORC2, u savců se pak odlišují od jiných tříd písmenem M: mTORC1 a mTORC2. Zatímco mTORC1 je aktivován množstvím aminokyselin, růstových faktorů a ATP, mTORC2 je aktivován pouze růstovými faktory. Z aminokyselin je nejúčinnějším aktivátorem mTORC1 leucin. Mechanismus působení leucinu spočívá v jeho alosterické aktivaci GDH, na kterou se přímo váže. Leucin tak stimuluje deaminaci glutamátu a syntézu 2OG, který aktivuje mTORC1 skrze prolyl hydroxylázy, enzymy spadající do rodiny 2OG dependentních dioxygenáz (28). mTORC1 může být regulován pomocí GLS2. Ukazuje se, že aktivita této jaterní isoformy GLS, jejíž význam v nádorových buňkách není dosud příliš jasný, koreluje u buněk HepG2 s aktivitou mTORC1 (32). Je známo, že aktivace GDH leucinem hraje klíčovou roli v sekreci inzulínu pankreatickými beta buňkami. Je tedy hypoteticky možné, že se mTORC1 také podílí na sekreci inzulínu (50).

mTORC1 se navíc podílí i na syntéze proteinů při již zmiňovaném růstu a proliferaci buněk. Všechny tyto aspekty, které jsou vzájemně propojené s glutaminolýzou, rovněž vysvětlují závislost nádorových buněk na glutaminu a především fakt, že syntéza mTORC1 je v nádorových buňkách zpravidla zvýšená (29).

V hypoxii dochází k stabilizaci HIF1 α a k jeho translokaci z cytoplazmy do jádra, kde dimerizuje s HIF1 β a vzniklý HIF komplex začíná být transkripčně aktivní (51). HIF komplex asociuje s regulačními regiony HRE a váže se na transkripční koaktivátory, přičemž stimuluje genovou expresi různých genů (52). Naproti tomu v normoxii se HIF1 α rozpadá a nelze ho standardními metodami (např. western blot) téměř detekovat (53).

HIF1 α je pro regulaci glykolýzy i glutaminolýzy zásadní. Na stimulaci přeměny glutaminu na 2OG se HIF1 α podílí stejnou měrou jako na glykolýze (32). V návaznosti lze tedy říct, že hypoxie posune metabolismus glutaminu z oxidace směrem na reduktivní karboxylaci (RK). Tento fenomén byl potvrzen například na buňkách prsního karcinomu HTB126 (54).

Isocitrátdehydrogenáza

Eukaryotický genom obsahuje tři geny Isocitrátdehydrogenázy (IDH1-3). IDH3 gen kóduje NAD⁺ dependentní oktamer (4 α , 2 β a 2 γ podjednotky), vyskytující se v mitochondriální matrix, který katalyzuje reakci Krebsova cyklu – ireverzibilní oxidativní dekarboxylaci isocitrátu. Jako kofaktor IDH3 slouží dvojmocné kationty Mn²⁺ a Mg²⁺. Enzym je pozitivně alostericky regulován Ca²⁺, ADP a citrátem a negativně ATP, NADH a NADPH (37).

Všechny isoformy se od sebe více či méně liší, a to nejen substráty, koenzymy, ale i lokalizací v buňce. Navíc isoformy IDH1 a 2 strukturálně ani geneticky nesouvisí s isoformou 3 (37).

1.1.1.2 Isocitrátdehydrogenáza 1

IDH1 gen kóduje NADP⁺ dependentní enzym, který se vyskytuje v cytosolu a v peroxisomech (38). IDH1 isoforma tedy může přispívat k produkci cytosolického NADPH, díky přeměně isocitrátu na 2OG. Tato reakce však nemusí být v nádorových buňkách nutně ireverzibilní, neboť IDH1 se podílí i na RK, jejíž průběh je podmíněn dostatkem NADPH (39). Směr reakce závisí na okolním prostředí buňky. Známým aktivátorem reverzní dráhy je HIF1 α , respektive hypoxické prostředí (37). Dále bylo objeveno, že může katalyzovat i syntézu 2HG, rovněž za spotřeby NADPH a produkce NADP⁺ (56).

1.1.1.3 Isocitrátdehydrogenáza 2

Jedná se mitochondriální enzym, který je NADP⁺ dependentní. Stejně jako IDH1 může produkovat NADPH a katalyzovat reakci Krebsova cyklu – přeměnu isocitrátu na 2OG. Tento enzym je významný pro nádorové buňky, kde katalyzuje RK a syntézu 2HG (41). Stejně jako u IDH1, i zde platí, že mutace jediného kodonu (v případě IDH2 R 140 nebo R 172) způsobí mnohonásobně vyšší produkci 2HG (42). Tyto mutace, včetně R 132 mutace u IDH1, byly nalezeny markantně u 2. a 3. stádia gliomových buněk (57) a u akutní myeloidní leukémie (AML) (58). Méně frekventované jsou tyto mutace u primárních glioblastomů a dalších typů nádorových nemocí (69). 2HG slouží jako významný biologický marker v séru pacientů trpících AML a jeho vysoký obsah tak představuje jasný ukazatel tohoto onemocnění, již v raném stádiu této nemoci, neboť je produkován transformovanými buňkami přímo v krvi (58).

Další nezanedbatelný význam IDH2 spočívá v její schopnosti ovlivnit redoxní rovnováhu nádorových buněk, právě díky závislosti RK na NADPH a oxidativní dekarboxylace na NADP⁺.

1.1.1.4 Isocitrátdehydrogenáza 3

Podobně jako IDH2 se tento enzym vyskytuje v mitochondriích, ale nijak nepřispívá k produkci NADPH. Má však nezanedbatelný vliv na bioenergetiku díky produkci NADH, vznikajícímu v Krebsově cyklu, a následné přeměně tohoto redukčního ekvivalentu na energii v respiračním řetězci (59).

Reduktivní karboxylace nádorových buněk

RK je reverzní dráha Krebsova cyklu, která se podílí na tvorbě prekurzorů potřebných pro proliferaci nádorových buněk. Tato reakce je katalyzována enzymem IDH2, která z 2OG vytváří isocitrát reduktivně (60). Významnou anaplerotickou dráhou této reakce je glutaminolýza, jež produkuje právě 2OG, který je reverzně využíván na isocitrát, a dále zpětnou akonitázovou reakcí na citrát, který může být dále exportován do cytosolu, a pomocí ATP:citrát lyasy přeměněn na acetyl-CoA a oxalacetát, popřípadě může být citrát pomocí cytosolické IDH1 zase oxidován na 2OG. Acetyl-CoA pak dále slouží jako prekurzor pro tvorbu lipidů. Oxalacetát může být dále přeměněn na malát, který je dále metabolizován (29).

Obecně lze říct, že funkce IDH2 umožňuje vznik metabolitu citrátu, potažmo mastných kyselin z glutaminu, čímž podporuje růst rakovinných buněk i v nepřítomnosti glukózy, či při hypoxii (62). Pochopitelně míra hypoxie, respektive angiogeneze a vaskularizace se liší dle druhu nádoru.

Buňky, které aktivují dráhu RK, získávají proto výhodu oproti buňkám s neaktivní RK. Není zatím zcela jasné, jakým způsobem karcinogeneze indukuje RK.

Reduktivní karboxylace navazující na glutaminolýzu byla poprvé popsána v buňkách hnědého tuku (63), ve kterých je až 90% glutaminu (Gln) zpracováno reduktivně, a až 40% lipogenního acetyl-CoA pochází právě z něj. Následně byla reduktivní karboxylace spojena s poškozením mitochondriálního oxidativního metabolismu (64). V buňkách s vnesenou mutací respiračního řetězce, cybridech CYTB 143B probíhá syntéza citrátu majoritně reduktivní karboxylací 2OG vznikajícího glutaminolýzou, na rozdíl od kontrolních WT 143B buněk, které 2OG oxidují v Krebsově cyklu a prekurzorem citrátu je glukóza (pyruvát). Citrát exportovaný z mitochondrií slouží jako lipogenní substrát (64).

Ke zvýšené RK a glutaminolýze pak docházelo i v hypoxii, kdy je potlačen respirační řetězec (36). V důsledku hypoxie a inhibice enzymů Krebsova cyklu dochází k inhibici pyruvát dehydrogenázy (PDH), proto se logicky předpokládá značná restrikce toku pyruvátu do mitochondrií. Avšak zajímavý nález u buněk SF188 ukázal, že i při dvojnásobném nárůstu produkce laktátu byl pokles buněčného

citrátu pouze 25% vzhledem k normoxii, citrát tedy musí být kompenzován nezávislou dráhou (36). Podobně, jako v případě mitochondriální poruchy, i v hypoxii je majoritní množství citrátu syntetizováno reduktivně z 2OG na rozdíl od prostředí normoxie, kde je hlavním zdrojem citrátu glukóza (36). Zdá se tedy, že k aktivaci RK dochází při potlačení mitochondriální oxidace (hypoxie či poškození), a slouží k udržení hladiny citrátu pro podporu proliferace v podmínkách se sníženou možností oxidace substrátu.

Dále byla RK prokázána i v buňkách RCC karcinomu ledvin s mutací von Hippel Lindau tumor supresorového proteinu (pVHL; the von Hippel Lindau tumour suppressor protein), ve kterých je chronicky aktivovaný HIF1 α (tedy i zvýšená aktivita LDH a snížená aktivita PDH). RCC tedy vykazují molekulární charakteristiky hypoxických buněk (65).

Výzkum lidských fibroblastů izolovaných z předkožky rovněž prokázal existenci RK a zároveň jí přiřazuje funkci jakéhosi NADPH přenašeče (shuttle). NADPH při RK redukuje 2OG na isocitrát, následně citrát, jenž je dále exportován do cytosolu, kde může být díky IDH1 zpětně oxidován na 2OG za vzniku cytosolického NADPH (66). Jelikož redukční ekvivalenty neprocházejí snadno skrze membrány, jedná se o další způsob mezikompartmentové transhydrogenace.

Dalším faktorem pro průběh mitochondriální RK je dostupnost NADPH, směr reakce IDH2 je daný afinitou k NADPH (Km pro NADPH je nižší než k NADP) a přítomností substrátu, potažmo enzymů participujících na RK. Zároveň existence RK, či její zvýšená míra, může ovlivnit jak v cytosolu, tak v mitochondriích NADPH homeostázu a redoxní rovnováhu v buňce spojenou s oxidačním stresem (69).

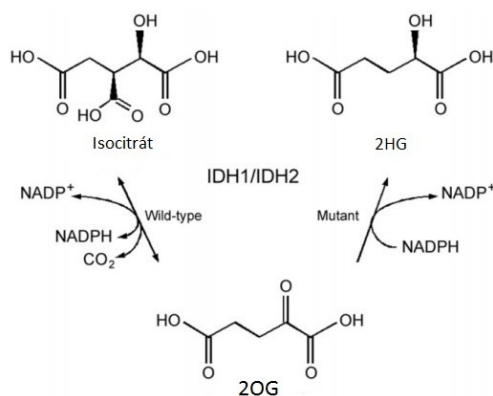
1.1.1.5 2-hydroxyglutarát jako onkometabolit

Zjednodušeně řečeno, 2OG může být přeměněn – oxidován – v Krebsově cyklu, popřípadě pomocí IDH2 může být reverzně karboxylován, nebo z něj může být syntetizován 2HG jednoduchou redukcí keto-skupiny. Ovšem zásadní pro pochopení této problematiky je i fakt, že 2OG slouží jako kofaktor pro mnoho enzymů, přičemž 2HG se díky molekulárně-strukturní podobnosti může vázat na aktivní místo pro 2OG (68 – 70).

Jak již bylo naznačeno výše, v současné době je známo několik enzymů, jež přispívají k produkci 2HG. Krom identifikace daného enzymu jako producenta 2HG je podstatné i který z enantiomerů (R/S-2HG) produkuje. Výše popsané dráhy, jež katalyzují GLO1, HAGH, PHGDH a HOT, produkují R-2HG (71 – 74). Nově byly ale popsány další enzymy produkující 2HG: laktátdehydrogenáza-A a mitochondriální malátdehydrogenáza v téměř anoxických podmínkách produkují S-2HG v nádorových buňkách, což podporuje malignitu podobně jako R-2HG (75).

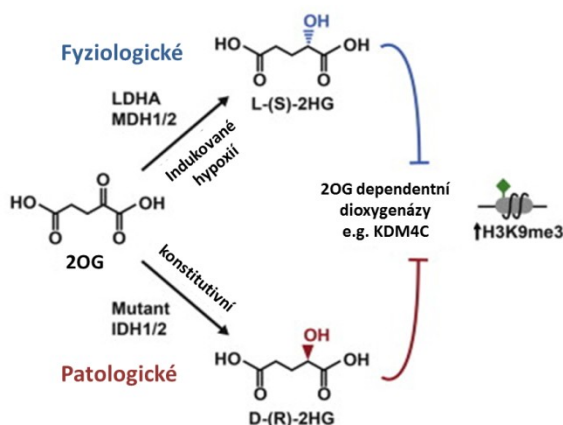
Mutace v enzymech nádorových buněk, zahrnující i IDH1 a IDH2, silně implikují pozměněný metabolismus v průběhu tumorigeneze (76). IDH1/2 může katalyzovat přeměnu isocitrátu na 2OG a zároveň i syntézu 2HG (29). Pochopitelně se v nádorových buňkách vyskytují i mutované i nemutované formy těchto enzymů, přičemž markantní rozdíl je vidět hlavně v množství syntetizovaného 2HG (77, 78). Dlouhou dobu se předpokládalo, že za syntézou 2HG stojí pouze bodové mutace těchto enzymů (79, 80), ovšem nově bylo prokázáno, že nádorové buňky tvoří 2HG i bez mutace IDH1/2 (18, 65). Konkrétní mutace se vyskytuje u některých nádorových onemocnění na IDH2 v Arg140 nebo Arg172, u IDH1 pak byla nalezena v Arg132 (81 – 84). V současné době byla objevena nová místa mutace na těchto enzymech, které se vyskytují kromě AML a gliomu i v chondrosarkomech, cholangiokarcinomech a v lymfomu angioimunoblastických T-buněk (76).

Mutace IDH1/2 u gliomů a vůbec u většiny oligodendroglálních tumorů vždy souvisí s jinými molekulárními aberacemi, jako třeba s *TP53* mutací nebo ztrátou (kodelecí) 1p/19q v chromozomech (96). Není známo, jestli je kodelece spojena se zvýšenou expresí mutované IDH1 a 2 přímo či nepřímo, ale je potvrzeno, že tato změna na chromozomu způsobí lepší životaschopnost oligodendroglomu a sníží citlivost na léčbu (82 – 84). IDH1 a IDH2 mutace a s tím spojená zvýšená koncentrace 2HG v séru slouží jako prognostický marker u pacientů s intrahepatickým cholangiokarcinomem, akutní myeloidní leukémií a gliomy (71, 86 – 88).



Obrázek 1 Enzymatická aktivita mutované a nemutované IDH1/IDH2 v buňkách multiformního glioblastomu. Upraveno dle (89).

Význam 2HG nespočívá jen v usnadnění diagnostiky pacientů, ale podílí se – na úrovni buňky – na inhibici prolylhydroxylás (PHD) a s tím související stabilizaci HIF1 α , jež je následována např. aktivací genu pro SLC2A1 (solute carrier family 2, member 1), kódující glukózové transportéry nebo VEGF, podílející se na angiogenezi (90). Bylo prokázáno, že 2HG kompetitivně inhibuje 2OG dependentní dioxygenázy (Obrázek 2), zahrnující histon demethylázy, prolyl hydroxylázy (PHDs), kolagen prolyl-4-hydroxylázy a TET rodinu 5-methylcytosin hydroxyláz, což způsobuje široké genomové změny histonů a metylaci DNA (70, 91). Díky těmto změnám zůstávají leukemické buňky dediferencované, což podporuje jejich proliferaci a přežití (49). Upregulace c-Myc sledovaná v prsním karcinomu bez mutace IDH1/2 také vede k několikanásobné akumulaci 2HG a ke globálním změnám epigenomu, což významně zhoršuje prognózu (44). Zajímavé je, že mTORC1 a HIF1 α , dva zásadní regulační proteiny buněčného metabolismu a proliferace, které bývají deregulovány v nádorových buňkách, jsou také řízeny PHDs, čímž mohou být ovlivněny zvýšením hladiny 2HG (69, 70, 92, 93).



Obrázek 2 Produkce S-2HG při katalytické reakci s laktátdehydrogenázou-A a mitochondriální malátdehydrogenázou v hypoxii. Upraveno dle (75)

Otázka významu 2HG však není stále definitivně zodpovězena a rozhodně to neusnadňuje fakt, že 2HG má jeden chirální uhlík. Doposud není ani jednotný názor na efekt 2HG na 2OG-dependentní dioxygenázy (2OG-DD).

Některé studie na nádorových buňkách naznačují, že jednotlivé enantiomery působí odlišně – R-2HG, na rozdíl od S-2HG, aktivuje *EGLN* (gen kódující enzymy HIF-prolyl hydroxylázu 2 (HIF-PH2) a prolyl hydroxylázovou doménu-obtávající protein (PHD2)), což má za následek redukci HIF. Zároveň vyšší hladiny 2HG přispívají k zvýšené proliferaci (69, 93). Ovšem Tarhonskaya et al. prokázali, že jednotlivé enantiomery mají stejný vliv a aktivují 2OG oxygenázy, ačkoliv v této práci bylo pracováno s nefyziologicky vysokými koncentracemi 2HG (68).

Není tedy zatím jasné, který z enantiomerů je běžně produkován v tumorech. V ledvinovém nádoru je produkován díky IDH1/2 L-2HG (S-2HG) a k inhibici 2OG-DD dojde právě díky L-2HG (94). Andersson et al. (2011) uvádějí jako produkt IDH1/2 R-2HG v leukemických buňkách (42). A právě díky inhibici IDH1, která se běžně podílí na obrovské produkci 2HG, dochází k horšímu růstu kolonií AML, včetně diferenciací AML buněk, a k delšímu přežití pacientů (95).

2 Cíle práce

Pochopení metabolismu a patologie nádorových buněk patří v současné době k nejdůležitějším tématům vědeckého výzkumu. Transformované buňky mění svůj metabolismus a adaptují se tím na zvýšenou, respektive nekontrolovanou míru proliferace a invazivitu. Jedním z adaptačních mechanismů je zvýšená míra zapojení RK do metabolismu buňky. Řada studií ukazuje, že tato dráha má sloužit pro anabolické procesy spojené právě s proliferací. Bylo potvrzeno, že je tato reverzní reakce posílena v hypoxickém prostředí, a ve zvýšené míře spotřebovává NADPH. Význam RK pro nádorové buňky nebyl ještě zcela objasněn. V řadě nádorových linií, včetně námi použitých, nebyla RK ani její spojitost s metabolismem glutaminu doposud prokázána vůbec. IDH2, participující na RK, slouží i jako enzym, který se významně podílí na syntéze 2HG. Tento (původně onkometabolit) se podílí i na epigenetických změnách, které rovněž přispívají k proliferaci.

Ve zdravých buňkách zatím dosud nebyla uspokojivě zodpovězena otázka významu 2HG, ani nebyla jednoznačně prokázána jeho přirozeně fyziologická hladina, nepočítáme-li jeho diagnostické využití u leukemických pacientů. V kontextu teorie o metabolickém remodelingu, kde nádorové buňky přejímají to nejlepší od zdravých buněk, by pak právě nenádorové buňky mohly být z hlediska výzkumu 2HG předobrazem celkového řešení problému.

Dle dosavadního výzkumu existuje reálná šance, že právě 2HG by mohl být úspěšně využit i jako marker prsních karcinomů.

Cílem práce bylo:

- 1) **Prokázat existenci RK v nádorových buňkách prsního karcinomu HTB-126 a MDA-MB-231**
 - Prokázat závislost RK na glutaminolýze
 - Prokázat význam IDH2 jako enzymu, který se nezanedbatelně podílí na fungování RK a syntéze 2HG
 - Porovnat tyto poznatky v hypoxii (HPX) a v normoxii (NMX), případně v dalších podmínkách, které simulují to, čím při proliferaci nádorové buňky procházejí.
- 2) **Prokázat existenci syntézy 2HG ve zdravých buňkách**
 - Vliv syntézy 2HG na proliferaci nádorových a zdravých buněk.
- 3) **Pomocí analýzy klinických vzorků stanovit koncentraci 2HG u pacientek s karcinomem prsu v moči a séru a najít korelaci mezi hladinami tohoto metabolitu a stádiem (stage) nemoci.**

3 Materiál a metody

3.1 Tkáňové kultury

Chemikálie pocházely převážně ze Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Estrogen receptor–negativní buňky prsního karcinomu, HTB-126 (Hs 578T), nenádorové HTB-125 (prsní epitel, Hs 578Bst), MDA-MB-231 (epiteliální) buňky adenokarcinomu, SHSY5Y neuroblastomové buňky, buňky potkaního inzulinomu INS1E a buňky pankreatického adenokarcinomu PaTu 8902 byly zakoupeny z ATCC. Glukózové medium bylo připraveno z glucose-free Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, ÚMG, Praha) doplněného o glukózu s výslednou koncentrací 25 nebo 5 mM, glutaminem s výslednou

koncentrací 4 mM, 10% fetal calf serum (FCS, Biochrom, Berlin, Germany), 10 mM HEPES, 1 mM pyruvát, 1.5 g/l NaHCO₃, 100 U/ml penicillin, 100 U/ml of streptomycin.

Rakovinné buňky tlustého střeva HCT116 a též buňky s knock-in mutací R132C na IDH1 (HCT116 R132C) byly zakoupeny od firmy Horizon Discovery (Cambridge, Anglie). Glukózové médium pro HCT116 bylo připraveno z RPMI-1640 doplněného o glukózu s výslednou koncentrací 11 mM, glutaminem s výslednou koncentrací 2 mM, 10% fetal calf serum (FCS, Biochrom, Berlín, Německo), 10 mM HEPES, 1 mM pyruvát, 1.5 g/l NaHCO₃, 100 U/ml penicillin, 100 U/ml of streptomycin. Stejně médium, obohacené merkaptoethanolem (4 µl/l), bylo použito pro INS1E.

Všechny buněčné linie byly kultivovány ve vlhčeném vzduchu s 5% CO₂ v inkubátoru s 37°C. Hypoxie pro kultivaci buněk byla dosažena díky hypoxické komoře (Scitiver N, Ruskin, Pencoed, Anglie) s 5% CO₂ a kontrolovanou směsí vzduch/N₂ k získání 5% O₂.

Pro experimenty, ve kterých byla testována schopnost fyziologické hladiny 2HG stimulovat proliferaci, byla použita standardní popsání média i podmínky (normoxie, hypoxie). V případě 1% séra bylo přimícháno adekvátní množství FCS a zbylý objem byl doplněn vodou, aby výsledná koncentrace dalších komponentů odpovídala standardnímu protokolu. Nemodifikovaný, nederivatizovaný 2HG byl přidáván přímo do média v požadované koncentraci 2 a 5 mM, přičemž byl ošetřen, aby nedošlo ke kontaminaci tkáňové kultury. Koncentrace 2HG v buňkách, a vůbec schopnost prostupu přes buněčnou stěnu, byla ověřena v samotných buňkách pomocí GC-MS, přičemž bylo zjištěno zvýšení pouze ve fyziologických intencích buněk, ke kterému došlo například také po vystavení buněk hypoxii (více kapitola výsledky). Tím pádem byla ověřena i vhodnost námi užití koncentrace 2HG v médiu, aby optimální extracelulární hladiny.

Obdobně bylo postupováno při pěstování buněk SHSY5Y v hypoglykemických podmínkách 1mM glukózy, bez glutaminu. Obě komponenty byly nahrazeny v médiu vodou, pochopitelně s ohledem na úměrný přírůstek glukózy.

3.2 Silencing isocitrátdehydrogenázy 1 & 2

Silencing IDH2 v HTB-126 byl proveden pomocí pLenti6.3-V5-DEST vektoru s vloženou silencovací kazetou z pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR užívající BP/LR Gateway reakci (Life Technologies, Carlsbad, CA). Kazeta obsahovala reporterový gen EmGFP a sekvenci specifickou proti antiparalelnímu oligonukleotidu, označovanou jako mi280 a mi308, obě navržené pomocí BLOCK-iTRNAi Designer (Life Technologies). DNA bylo do buněk včleněno pomocí lentivirální transdukce (ViraPower Lentiviral Expression System, Life Technologies).

shRNA bylo použito pro silencing IDH2 v MDA-MB-231 vytvořením pěti shRNA, označované shA až shE. Hu-SH shRNA expressing vectors proti lidské IDH2 (TG312260) byly pořízeny z OriGene (Rockville, MD).

Stabilní linie HTB-126 mi280 a mi308 byla ošetřována (udržována) selekčním antibiotikem blastidinem (1 mg/ml; miRNA) a linie MDA-MB-231 byla ovlivněna puromycinem (0,5 mg/ml; shRNA).

IDH1 byla silencována pomocí Silencer Select Pre-designed siRNA (Life Technologies). Buňky HTB-126 nebo mi280 a mi308 buněčné linie (10⁶) byly transfekovány s 30 nM siRNA nebo pro „mock“ negativní kontrolu pouze činidlem Oligo-ectamine reagent (Life Technologies) a byly sklizeny 48 hodin po transfekci.

3.3 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Pomocí GC/MS byly měřeny polární buněčné metabolity; především karboxylové kyseliny Krebsova cyklu – jejich koncentrace a inkorporace ¹³C (Obrázek 3). Koncentrace byla měřena pro citrát, malát, 2HG, 2OG, fumarát a laktát. Retenční čas metabolitů byl ověřen pomocí standardů (Sigma Aldrich), které byly zároveň pomocí hmotnostního detektoru „proskanovány“ v módu SCAN a z celého získaného spektra pro daný analyt byl vybrán fragment molekuly (m/z), který byl dále měřen v módu SIM (selected ion monitoring), čímž se dosáhlo přesnějších výsledků a nižší meze stanovitelnosti. Zároveň byla spektra pro jednotlivé látky zkontrolována v komerční knihovně

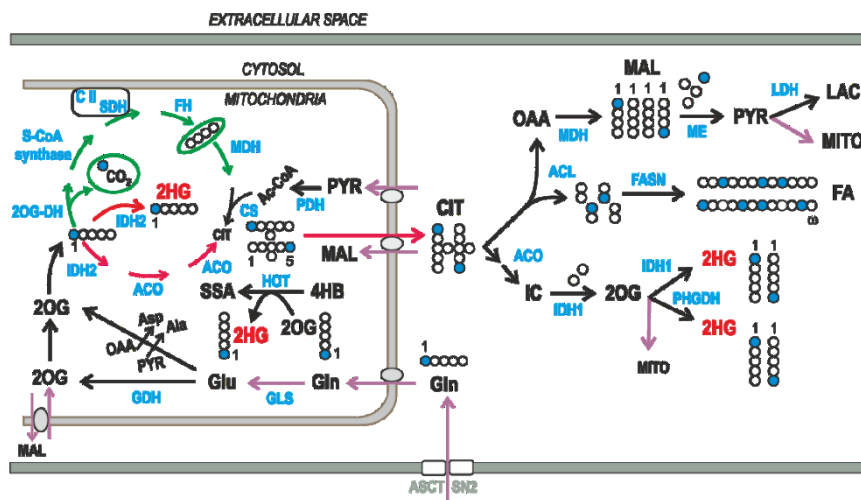
spekter NIST. Se znalostí spekter komerčních standardů, a s retenčním časem pak nebylo v reálném vzorku problematické ověřit identitu konkrétního analytu.

Preanalytická fáze

Metabolity byly získány z tkání nebo *in vitro* experimentů s tkáňovými kulturami, popřípadě ze séra potkanů či média.

V jednotlivých fázích preanalytické přípravy bylo především dbáno na maximální možnou inhibici všech metabolických pochodů, které by přivodily nedenaturované enzymy, jež by způsobily změnu poměrů jednotlivých metabolitů. V důsledku toho byly vzorky po sklizení zamrazeny, jejich převoz probíhal na ledu a analytická příprava musela být efektivní a rychlá. Experimentálně bylo ověřeno, že vzorek, který je více jak 60 minut rozmrazen v prostředí PBS, či média, v pokojové teplotě, aniž by byl zpracován, je znehodnocen.

3.3.1.1 Design experimentu s 1-¹³C-glutaminem - Princip izotopického značení



Obrázek 3 Inkorporace ¹³C uhlíku (modře zvýrazněný) z 1-¹³C glutaminu do 2-oxoglutarátu (2OG) a následně reduktivní karboxylaci do citrátu. Znázorněný citrát-malátový antiport exportuje citrát do cytosolu, kde vzniká malát.

Princip metody inkorporace ¹³C do metabolitů spočívá v jednoduchém mechanismu, který neumožňuje inkorporaci jinam než do metabolitů RK. 1-¹³C-glutamin se přemění při glutaminolýze na 1-¹³C-2OG, který může být dále metabolizován v dopředném směru na sukcinyl-CoA, čímž dojde k odštěpení ¹³CO₂ a následné ztrátě značky z Krebsova cyklu. Díky RK však může být 2OG karboxylován a přeměněn na citrát, který nese izotopicky značený uhlík (Obrázek 3). Část citrátu je dále exportována do cytosolu, kde je díky ATP-citrát lyáze přeměněn na oxalacetát (dále pak malát) a acetyl-CoA pro tvorbu lipidů nebo díky cytozolické akonitáze přeměněn znovu na isocitrát a pomocí IDH1 na 2OG. 2OG zároveň v cytosolu i v mitochondriích slouží jako prekurzor pro tvorbu 2HG. Není tedy možné (na rozdíl od 1-¹³C-citrátu a 1-¹³C-malátu) určit na GC/MS z jaké reakce 1-¹³C-2HG pochází.

Buňky byly pěstovány do odhadované konfluencie 80 – 90%, zpravidla tři dny od nasetí byl proveden experiment. V den experimentu bylo kultivační médium nahrazeno na 6 hodin médiem s 1-¹³C-glutaminem, který byl ve stejné koncentraci jako neznačený glutamin v původním médiu. Poté byly buňky pomocí trypsinu sklizeny, buněčná suspenze byla stočena a buněčná peleta byla po odsátí supernatantu (trypsin ředěný médiem) promyta PBS. Takto promytá peleta byla okamžitě zmrazena v -80°C, kde byla uskladněna do převozu a do vlastní analytické fáze přípravy vzorku.

V případě ovlivnění buněk běžně užívanými modifikátory buněčné respirace, odpřahovačem FCCP (2-[2-[4-(trifluoromethoxy)fenyl]hydrazinyliden]-propandinitril), antibiotikem oligomycinem a původním rostlinným jedem rotenonem, bylo buňkám vyměněno médium dle popsaného experimentálního schématu, ale 30 minut před sklizením byla do médií přidána účinná látka. Tento čas

byl určen podle publikované možnosti prostupu podobných látek přes membrány v přisedlých buňkách (96)

V případě užití galaktózového média byly buňky nasety při pasážování přímo do média s galaktózou a pěstovány 72 hodin. Jelikož buňky rostly pomaleji, bylo mnohem obtížnější odhadnout počáteční hustotu. Původně bylo médium buňkám vyměňováno druhý den od nasetí, ale ukázalo se, že hlavní vliv na správné přisednutí má především koncentrace séra, tudíž našim potřebám – ponechat buňky co nejdelší dobu v aglykemickém prostředí – vyhovoval systém pasážování přímo do média s galaktózou, bez glukózy.

V případě vzorků měřených v odlišných koncentracích CO₂ byly buňky na 72 hodin pěstovány v odlišné atmosféře a do média bylo přidáno Na₂HCO₃ v ekvivalentním množství, tj. pro 1% CO₂ pouze 1/5 objemu, zbytek byl suplován vodou. pH jednotlivých médií bylo ověřeno digitálním pH metrem v daném prostředí před i po experimentu, aby nedocházelo k měření artefaktů vlivem změny pufrací kapacity.

3.3.1.2 Design experimentu pro získání přesné koncentrace analytů

Metabolity byly měřeny ve vzorcích, ke kterým nebyl přidán značený glutamin. Právě inkorporace ¹³C byla důvodem, jenž u některých metabolitů znemožnil přesnou kvantifikaci. Mnohem jednodušší bylo zavést metodu čistě pro neznačené analyty. V rámci správného stanovení koncentrace bylo buňkám 24 hodin před experimentem vyměněno médium za čerstvé. Důvodem byla zhoršená reprodukovatelnost výsledků, pokud tak nebylo učiněno. Tento jev byl opakovaně pozorován a pravděpodobně ho způsobovalo snížení koncentrace živin po třídní inkubaci, což ovlivnilo i koncentraci sledovaných analytů a poměr jednotlivých anaplerotických drah. V den experimentu byly buňky pomocí trypsinu sklizeny, buněčná suspenze byla stočena a buněčná peleta byla po odsátí supernatantu promyta PBS, v témže roztoku resuspendována a v buněčné suspenzi byly spočítány buňky. Znovu stočená peleta byla okamžitě zmrazena v -80°C, kde byla uskladněna do převozu a do vlastní analytické fáze zpracování vzorku.

Analytická fáze získání metabolitů

Buněčné metabolity byly získávány modifikovanou Folchovou extrakcí z *in vitro* pěstovaných tkáňových kultur i orgánů vyjmutých z pokusných potkanů.

Z orgánů byly ještě ve zmrzlém stavu odkrojeny kousky, zváženy a urychleně homogenizovány v methanolu a až po homogenizaci byla přidána ve stejném objemu voda. Buněčná peleta z *in vitro* experimentu byla přímo lyzována směsí methanol/voda (1/1).

K vzorkům v polární fázi byl přidán chloroform a k vzniklé směsi (methanol/voda/chloroform = 1/1/2) byla přidána EDTA (výsledná c=50 μM) pro lepší fázové rozdělení polárních a nepolárních komponent a precipitaci proteinů na fázovém rozhraní.

Vzorky byly důkladně promíchány, protřepány a zvortexovány a následně centrifugovány při 1000 x g po dobu 10 minut.

Po stočení byla horní polární fáze oddělena a lyofilizována do úplného odpaření – v závislosti na objemu cca 6 – 12 hodin.

Při měření koncentrace metabolitů byl k buněčné peletě nebo k vzorku tkáně přidán před přípravou šťavelan sodný jako vnitřní standard.

GC-MS měření

Lyofilizované vzorky byly derivatizovány 60 minut při 60°C směsí pyridin/N,O-bis(trimethyl)silyl acetamid/chlorotrimethylsilanu v poměru 10/4/2. Derivatizační směs se vzorkem byla nastříkována přímo do plynového chromatografu 6890N (Agilent Technologies, USA) s MS detekcí 5973N (Agilent Technologies, USA). V ověřených spektrech metabolitů byly vybrány specifické ionty pro SIM detekci (selected ion monitoring): vnitřní standard m/z 190, citrát m/z 273, malát m/z 335, 2HG m/z 349, 2OG m/z 347, laktát m/z 219, fumarát m/z 245. Pro SIM izotopicky značených metabolitů byl zvolen iont m/z M+1.

Postanalytická fáze – vyhodnocení výsledků

Výsledky byly vyhodnoceny na základě níže uvedených výpočtů.

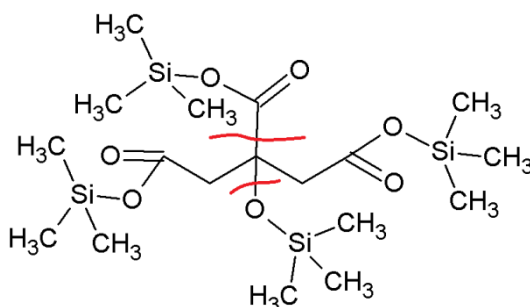
3.3.1.3 Výpočet relativní inkorporace ^{13}C

Míra inkorporace (MI) byla vypočítána jako procentuální zastoupení metabolitu s molekulární hmotností o jednu větší (M+1). Procenta byla spočítána z ploch píků pro metabolity s inkorporací M+1 a bez inkorporace M (a.).

$$\text{a. } MI = \frac{M+1}{M+(M+1)}$$

Pro stanovení inkorporace bylo ovšem důležité stanovit pozadí, které vyjadřuje pravděpodobnost s jakou se iont M+1 bude přirozeně vyskytovat, protože i samotné vzorky bez ^{13}C -glutaminu mají přirozeně zastoupené izotopy M+1, tudíž samotná MI bez korekce pozadí nemá skutečnou výpovědní hodnotu. Pozadí bylo spočítáno pro jednotlivé molekulární fragmenty (ionty), které byly měřeny v SIM modu na GC/MS a následně ověřeny experimentálně.

Pro měření RK byl zvolen ion citrátu m/z 273 (Obrázek 4), malátu 335 (Obrázek 5) a 2HG 349 (Obrázek 6).



Obrázek 4 Molekula citrátu po derivatizaci trimethylsilylační směsí. Červené čáry naznačují místa, která se s největší pravděpodobností odštěpí při ionizaci MS

Iont citrátu má po odštěpení fragmentů atomy v množství 11xC, 2xSi, 4xO a 22xH.

Výpočet pozadí (P) byl proveden dle průměrného, známého, procentuálního výskytu M+1 izotopů pro jednotlivé atomy (i), který byl vynásobený jejich množství X (b.).

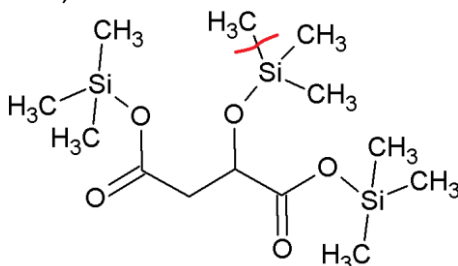
$$\text{b. } P = \sum \%_i \cdot X_i$$

Po dosazení dat (1,1% ^{13}C ; 4,67% ^{29}Si ; 0,015% ^2D ; 0,039% ^{17}O) do rovnice získáme vztah pro citrát:

$$P_{\text{citrát}} = 1,1\% \cdot 11 + 4,67\% \cdot 2 + 0,015\% \cdot 22 + 0,039\% \cdot 4$$

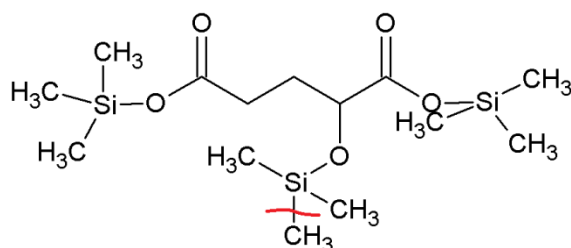
$$P_{\text{citrát}} = 21,926\%$$

Další molekulou je malát 335, což je molekulární iont bez jednoho methylu (Obrázek 5) se sumárním vzorcem $\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{O}_5\text{Si}_3$ a $P=27,81\%$.



Obrázek 5 Molekula malátu po derivatizaci trimethylsilylační směsí. Pro MS detekci je použit fragment postrádající methylovou skupinu.

Stejně jako iont malátu, je i iont 2HG 349 fragment, který postrádá jednu methylovou skupinu (Obrázek 6). Jeho strukturální vzorec je $\text{C}_{13}\text{H}_{29}\text{O}_5\text{Si}_3$ a $P=28,94\%$.



Obrázek 6 Molekula 2HG po derivatizaci trymethylsilylační směsí. Pro MS detekci je použit fragment postrádající metylovou skupinu.

Výpočet pozadí u všech molekul byl odlišný než experimentální výsledek. Hodnota změřená na GC/MS se lišila zhruba o 2,5 až 5 jednotek %, což odpovídalo 20% z celkové teoreticky vypočítané hodnoty, přičemž skutečná, naměřená hodnota byla vždy nižší. Tento jev je s největší pravděpodobností způsoben samotnou pravděpodobností, s jakou se vyskytují M+1 a M+2 molekuly ve směsi. Teoretický výpočet nezohledňuje možnost, že jedna molekula může obsahovat dva atomy A+1. V tom případě by pak daná molekula měla M+2, což díky našemu nastavení SIM modu na GC-MS nejsme schopni detekovat. Procentuálně se nám tedy snižuje zastoupení molekul pouze s jedním izotopem díky možným permutacím ve výskytu izotopů. Procento takto spárovaných atomů (M+2 a více) sice není vysoké, ale zároveň při takto velkých molekulách není ani zanedbatelné. Navíc tento výpočet je vhodný pouze pro malé molekuly a pro molekuly mnohem větší bývají využity komplexnější matematické modely, zahrnující sofistikovanější vzorce pro výpočet distribuce izotopů (97). Ve všech experimentech se značeným glutaminem byly proto měřeny kontrolní vzorky, ke kterým nebyl přidán izotopicky značený glutamin. Experimentálně ověřené hodnoty P byly použity pro výpočet inkorporace (P_{exp}). Nutno podotknout, že experimentálně zjištěné pozadí sice nebylo přesně shodné s teoretickým, ale pokaždé vykazovalo stejné hodnoty, samozřejmě s ohledem na chyby při odečítání píků v různých experimentech. Teoretické hodnoty sloužily pro kontrolu správnosti měření.

Výpočet míry inkorporace s korekcí experimentálně zjištěného pozadí byl následovný:

$$c. \quad MI_{kor} = MI - P_{exp}$$

MI_{kor} je skutečná inkorporace po odečtení experimentálně zjištěného pozadí přírodně zastoupených ^{13}C molekul.

V případě, že bychom odečítali teoretické hodnoty P, vnášeli bychom si systematicky chybu a snižovali míru inkorporace.

MI je naměřená inkorporace včetně přírodně zastoupených ^{13}C molekul

P_{exp} je experimentálně zjištěné pozadí ve vzorcích bez použití ^{13}C -glutaminu

3.3.1.4 Výpočet koncentrace metabolitů u experimentů bez přidání značeného glutaminu

Zásadní pro kvantifikaci se ukázalo použití vnitřního standardu. Díky nestabilitě derivatizačního činidla a jeho náchylnosti na působení vzdušné vlhkosti docházelo i během měření k částečné degradaci vzorku, proto bylo nutné vztahovat plochy píků metabolitů k nějaké strukturně podobné látce, která vykazuje podobný retenční čas, ale nevyskytuje se přirozeně v buňkách. Experimentálním ověřením byla pro tento účel zvolena kyselina šťavelová, jejíž množství je v tkáních v rámci šumu zanedbatelné (nebylo ji možné stanovit ani kvalitativně), a navíc je po přidání snadno detekovatelná a relativně stabilní. Z finančních důvodů nebylo možné použít izotopy značené standardy.

V odhadovaném rozmezí koncentrace metabolitů byly změřeny kalibrační přímky. Přesná koncentrace u reálných vzorků pak byla ještě přepočítána na počet buněk.

Přesná koncentrace byla vypočítána ze směrnice kalibrační přímky, přičemž na osu y byl vynášen poměr A_i/A_s , kde A_i je plocha píku analytu a A_s plocha píku vnitřního standardu šťavelanu. Osa x pak popisuje známou koncentraci standardu analytu c_{os} . Na základě předpokladu možné interpolace a extrapolace mohla být spočítána přesná koncentrace analytu pro konkrétní poměry A_i/A_s . Výsledná

hodnota byla ještě přepočtena na počet buněk. Ze vztahu $y = k \cdot x + q$, kde k je směrnice přímky a q posunutí po ose y , byla vypočtena směrnice jako:

$$\text{a. } k = \frac{y-q}{x}$$

Přičemž platí, že $q = 0$, když c_{as} (A_{as}) nebo koncentrace analytu c_i (A_i) = 0.

Lze tedy odvodit vztah pro k , přičemž po dosažení získáme tuto rovnici:

$$\text{b. } k = \frac{\frac{A_i}{A_s}}{c_{as}}$$

Po takto změřené a vypočítané směrnici pro jednotlivé standardy analytů mohla být vypočítána koncentrace analytu c_i v reálných vzorcích.

$$\text{c. } c_i = \frac{\frac{A_i}{A_s}}{x_{cell}}$$

x_{cell} zde představuje množství buněk. Výsledná koncentrace analytu ve vzorku pak byla vyjádřena v nmol/milion buněk.

V nádorových buňkách byly měřeny metabolity Krebsova cyklu (citrát, malát, fumarát, 2OG), včetně 2HG a laktátu.

3.4 Izolace orgánů z potkanů

Potkani byli usmrceni a z jejich těl byly urychleně vyjmuty potřebné orgány či jiné tkáně, které byly okamžitě zmrazeny v tekutém dusíku, aby došlo k minimálnímu posunu v hladině jednotlivých metabolitů. Po úplném zamrazení byly orgány přesunuty do mrazáku -80°C , kde byly uskladněny do analytické přípravy.

S potkany bylo zacházeno v souladu s platným zákonem na ochranu zvířat proti týrání.

V případě izolace hepatocytů byly dodrženy všechny zásady zákona na ochranu zvířat proti týrání.

Potkaní hepatocyty byly izolovány v laboratoři MUDr. Nikoliny Kutinové-Canové, Ph.D. ve Farmakologickém ústavu 1. LF UK podle standardního protokolu s použitím kolagenázy zajišťující rozpad jaterního pojiva. Izolované buňky byly následně zamrazeny ve Williamsově médiu obsahující 2 mM glutamin, 0,06% insulin a 5% FCS. V případě, že byly hepatocyty kultivovány 24 hodin na Petriho miskách, byly převezeny na ledu a v místě pokusu byly nasety v množství 8 mil/75 cm² misku a pěstovány v DMEM 5 mM glukózovém médiu. Misky pro nasetí buněk byly kolagenovány komerčním roztokem kolagenu I (Sigma Aldrich).

Fibroblasty byly izolovány z potkaní kůže (ucha) a kultivovány v již popsaném DMEM 5mM Glc médiu. Nejprve byl ušní lalůček opláchnut v ethanolu a ve sterilním PBS, poté byl pomocí nůžek rozstříhán na co nejmenší kousky, které byly následně na Petriho misce kultivovány do doby, než jednotlivé ušní fibroblasty nepřisedly na misku. Poté byly odstraněny zbytky kůže a buňky byly přepsáží do čisté Petriho misky. Následně byla tkáňová kultura standardně pasážíována.

V práci jsme porovnávali izolované fibroblasty: staré a mladé. Lišily se v počtu pasáží – mladé fibroblasty byly měřeny do 10. pasáže, zatímco staré fibroblasty byly pěstovány více než 30 pasáží.

3.5 Získání a zpracování krve a moči pacientek s karcinomem prsu a zdravých kontrol

Výzkum probíhá ve spolupráci s Onkologickou klinikou VFN a odběr vzorků je schválen etickou komisí. Samotný odběr srážlivé krve a moči probíhá přímo na Onkologické klinice, ve spolupráci s doc. MUDr. Petrou Tesařovou, CSc.

Moč je hned po odběru zamrazena v -80°C .

Krev je po odstání stočena při 3000 RPM po dobu 10 min. Sérum je odpipetováno a rovněž zamrazeno v -80°C .

V našem případě, kdy měříme 2HG jako ukazatel solidního tumoru není dobré měřit celou nesrážlivou krev, neboť signál analytu může být v tomto případě ovlivněn samotným složením krve, kde například bílé krvinky díky typické eukaryotické stavbě mohou produkovat 2HG a udržovat si jeho

intracelulární koncentraci, která by výsledně ovlivnila i náš signál. Ze stejného důvodu je nutné krev zpracovat dříve než dojde k hemolýze.

Znamé rozmrazené množství séra a moči (200 µl na vzorek) je dále připravováno podobně jako buněčný pelet při měření koncentrace metabolitů, tedy Folchovou extrakcí, s tím rozdílem, že k oběma fluidním vzorkům je přidáno malé množství NaCl (<10 mg) pro lepší precipitaci proteinů ve vodné fázi a jejich následné usazení v mezifázi methanol-voda/CHCl₃. Dále je vodná fáze odpipetována, lyofilizována a zpracována stejně jako ostatní biologické vzorky.

Před samotnou studií byla provedena studie stability analytu – 2HG. Ukázalo se, že 2HG je relativně stabilní a v samotných vzorcích nedochází k jeho degradaci ani po mnohahodinovém stání v pokojové teplotě.

3.6 Analýza Western Blot

Buňky byly trypsinem sklizeny z povrchu kultivační lahve, ke vzniklé suspenzi bylo přidáno médium a vzorek byl stočen při 300 x g/5 minut. Supernatant byl odsán a peleta promyta 1,5 ml PBS. Tato suspenze byla přepipetována do mikrozkušavky a opět stočena 300 x g/5 minut. PBS bylo odsáno a peleta lyzována/resuspendována adekvátním množstvím lyzačního pufru tak, aby se koncentrace proteinu v následném lyzátu pohybovala mezi 2-4 mg/ml. Po 20 min lyzaci na ledu byly vzorky stočeny 10000 x g/10 minut a supernatant byl odpipetován pro další postup.

Protein byl měřen podle standardního postupu pro „Pierce BCA assay“.

Vzorek byl připraven tak, aby bylo ve všech jamkách elektroforetického gelu stejné množství proteinu. Před dávkováním na gel bylo vypočítané množství lyzátu smícháno s vzorkovým pufrem na SDS-PAGE s merkptoethanolem (9:1), a s vodou. Namíchaná směs byla povařena 10 minut v 90°C. V každém vzorku bylo nanášeno 20 µg celkového proteinu na 10% SDS-PAGE a přebítováno na PVDF membránu (75 minut/0,3mA).

IDH2 byla detekována primární protilátkou vyvinutou v myši o koncentraci 1 µg/ml (Abcam). Jako sekundární protilátka byla užitá anti myši (Abcam). Pro vyvolání byl užit vyvolávací chemiluminiscenční roztok Luminata Forte Western (Merck).

3.7 Průtoková cytometrie (FACS)

FACS (BD LSR II s HTS) byl použit pro měření přírůstku produkce superoxidu v živých buňkách v časovém intervalu pomocí fluorescenční barvy MitoSOX (Life Technologies) a pro měření buněčného cyklu.

Buněčný cyklus

Buněčný cyklus byl měřen pomocí obarvení buněk jaderným cytofluorescenčním propidium iodidem (Life Technologies, Ex./Em.:535/617). Pro toto měření bylo důležité, aby buňky na miskách nebyly přerostlé, jelikož by to mohlo ovlivnit míru proliferace, a tím pádem vzájemné porovnávání vzorků. Obecně se totiž má za to, že buňky, které dosahují téměř 100% konfluency, mohou díky intercelulární komunikaci omezit míru proliferace a zpomalit metabolismus. Odhadovaná konfluency buněk se proto obvykle pohybovala mezi 50 – 70%. Vycházeli jsme z publikovaných metod (98, 99) a z protokolu od Life Technologies.

Buňky byly pěstovány 50 hodin v podmínkách bez sera ± 2HG, kontrolní buňky byly pěstovány s normalizovanou hladinou séra, a také v hypoxii.

Buňky byly sklizeny trypsinem, peleta byla promyta PBS, resuspendována a buňky spočítány. Poté byl rozdělén do zkumavek po 1,5 milionu buněk. Suspenze byla stočena (300 x g, 5min) a PBS bylo odsáto. Pelety se stejným počtem buněk byly fixovány vychlazeným 70% ethanolem, který byl postupně přikapáván za stálého vortexování. Ethanolicke suspenze byla ponechána v lednici po dobu minimálně 2 hodin, poté byly buňky stočeny (800 x g, 5 min) a ethanol byl opatrně odsán. Nakonec byly zafixované pelety promyty 5 ml PBS, znovu stočeny (PBS bylo odstraněno) a resuspendovány v 300 µl PBS obsahujícím RNAsu A o koncentraci 20 µg/ml (eliminace pozadí způsobeného nežádoucí RNA). Za pokojové teploty byla suspenze inkubována minimálně 5 minut a nakonec byl přímo k suspenzi přidán propidium iodid o výsledné koncentraci 100 µg/ml.

Takto ovlivněné vzorky byly prakticky okamžitě měřeny na FACS, kde bylo pro každý vzorek nasbíráno 20000 událostí a pomocí programu FlowJo bylo vyhodnoceno procentuální zastoupení G1/G0, S a G2 fáze.

3.7.1 Měření produkce superoxidu

Superoxid byl měřen na základě modifikovaného protokolu od společnosti Life Technologies, volně přístupného u požadovaného produktu – MitoSOX (Ex./Em.:510/580).

Kontrolní buňky byly pěstovány do 80% konfluence 50 hodin v daných podmínkách: v hypoglykémii 1mM Glc, bez glutaminu. K další skupině byl do stejného média přidán 2mM 2HG na 8 a 50 hodin. Tyto podmínky byly zvoleny s ohledem na charakter 2HG a metabolismus 2HG, to znamená, s ohledem na možnost vzniku 2HG přímo z glutaminu byl glutamin eliminován, a hypoglykémie byla zvolena za účelem prohloubení oxidativní fosforylace.

Napěstované buňky byly těsně před měřením sklizeny pomocí trypsinu, resuspendovány v 1 ml růstového média, přepipetovány do centrifugační zkumavky Falcon, do které byl posléze přidán 1 μ l rozpuštěné barvy MitoSOX o koncentraci 5 μ M. Výsledná koncentrace MitoSOXu v médiu byla tedy přibližně 5 nM. Buněčná suspenze byla ponechána 15 minut v inkubátoru při 37°C, poté byla stočena při 300 x g, 5 minut (podle potřeby buněk) a samotné médium s barvou bylo odsáno. Pelet byl znovu resuspendován v PBS a přepipetován do měřicí zkumavky kompatibilní s FACS.

Samotné měření bylo prováděno v režimu timelaps, kde bylo každou minutu nasbíráno 10000 událostí, jejichž průměrná fluorescence byla vynášena na časovou osu.

Vyhodnocení závislosti produkce superoxidu v čase bylo provedeno v programu Microsoft Excel, kde byla z přímky závislosti vypočtena směrnice, jejíž strmost odpovídala produkci superoxidu.

3.8 Metoda pro stanovení míry proliferace pomocí bromodeoxyuridinu

Výhoda této metody, na rozdíl od buněčného cyklu, je v jasné interpretaci výsledků, které připouští minimální spekulace. Zároveň díky inkorporaci 5-bromo-2'-deoxyuridinu do DNA můžeme jednoznačně říct, kolik buněk, respektive buněčné DNA se za daný časový úsek replikovalo.

Buňky (potkaní fibroblasty, neuroblastomy SHSY5Y) byly pěstovány na 6-jamkových Petriho miskách do konfluence 60 - 80% v popsaných podmínkách pro výzkum změny proliferace po ovlivnění 2HG (1% FTS \pm 2HG, hypoxie, normoxie). Následně jim bylo vyměněno médium za čerstvé s přísadkou 10 μ M 5-bromo-2'-deoxyuridinu (Roche; BrDU) a buňky byly inkubovány 3, respektive 16 hodin. Po inkubaci byly promyty PBS a fixovány kyselým ethanolem o pH 2 v -20°C minimálně 30 minut, následně po odsání ethanolu promyty 3 x 10 minut PBS. Fixace a následná rehydratace buněk způsobily jejich horší přilnavost k jamkám, proto bylo nezbytné při dalším postupu či promývání šetrné zacházení.

Po promytí PBS byly buňky inkubovány 60 minut s primární protilátkou proti BrDU (Cell proliferation kit, Roche). Anti-BrDU byla vymyta promývacím pufrem (0,05% Triton-X-100, 0,05% Tween 20 a 0,1 M glycin v PBS; Sigma-Aldrich), vzorky byly inkubovány se sekundární protilátkou „anti-mouse“ barvenou s Alexa Fluor 488 (Sigma-Aldrich) 60 minut, a opět 3x promyty PBS. Vzorky těsně před měřením byly ještě obarveny Hoechst 33342 (Molecular Probes), který obarvil všechna jádra.

Vzorky byly analyzovány na fluorescenčním mikroskopu, kde byly při 488 nm zobrazeny jádra rozdělených buněk, tedy jádra s inkorporovanou BrDU. Míra proliferace pak byla vypočítána jako procentuální zastoupení BrDU pozitivních jader vs. počet všech jader, která byla zobrazena při 342 nm díky Hoechst. Počet jader v daných vlnových délkách byl vypočítán v programu ImageJ.

4 Výsledky

4.1 Buňky prsního karcinomu

Pro potvrzení aktivity RK v nádorových buňkách byly zvoleny buňky lidského adenokarcinomu prsu HTB-126 a MDA-MB-231, protože na tomto buněčném modelu nebyla RK dosud prokázána. Buňky byly ovlivněny na několika úrovních: koncentrací kyslíku (bylo použito 5% O₂, tedy slabá hypoxie (HPX)), složením média (koncentrací glukózy, Glc) a na molekulární úrovni silencingem IDH2 a IDH1.

Citrát a malát jako marker reduktivní karboxylace

Jako marker RK byly zvoleny citrát a malát v kombinaci se specifickým metabolickým značením navrženým pro prokázání jak míry RK, tak glutaminolýzy (viz. Kapitola 3.3.1) jako významné metabolické dráhy. Byla měřena inkorporace ¹³C z izotopicky značeného glutaminu (Gln) do citrátu a malátu, metabolitů Krebsova cyklu. Současně s tím byla zkoumána dráha syntézy 2HG.

4.1.1.1 HTB-126

U citrátu došlo k inkorporaci ¹³C z Gln prostřednictvím RK v NMX i HPX, a v obou použitých koncentracích glukózy (Glc). V hypoxickém prostředí došlo k statisticky signifikantnímu zvýšení inkorporace u kontrolních buněk i buněk se silencingem IDH2 (mi280, mi308) pro 5 mM Glc ($p < 0,001$), a u kontrolních buněk a mi280 v 25 mM Glc ($p < 0,05$), a dále i u mi308 ($p < 0,001$).

Rovněž došlo k poklesu inkorporace u stabilních linií se silencingem IDH2 (mi280, mi308) v NMX i HPX, ovšem v různé míře v použité 5 a 25 mM Glc. V 5 mM Glc došlo ke statisticky signifikantnímu poklesu v NMX i v HPX ($p < 0,05$ pro mi280 i mi308). V 25 mM Glc došlo v NMX k signifikantnímu poklesu u mi280 ($p < 0,05$) i mi308 ($p < 0,001$), ke stejnému jevu došlo i v HPX ($p < 0,05$ pro inkorporaci u mi280 a mi308 s.

Zároveň je patrná zvýšená bazální inkorporace v 25 mM Glc médiu v NMX oproti 5 mM Glc NMX, neplatí však pro HPX.

U malátu, stejně jako u citrátu, došlo k inkorporaci ¹³C prostřednictvím RK v NMX i HPX, v obou použitých koncentracích Glc.

V HPX prostředí došlo k statisticky signifikantnímu zvýšení inkorporace u kontrolních buněk v 5 mM ($p < 0,05$) i 25 mM Glc ($p < 0,001$), ale u buněk se silencingem IDH2 (mi280, mi308) pouze v 25 mM Glc ($p < 0,001$). RK v buňkách mi280 a mi308 pěstovaných v 5 mM Glc nebyla vlivem HPX signifikantně zvýšená, a dokonce u mi280 a mi308 byla mírně snížena.

V obou použitých koncentracích glukózy (v 25 mM i 5 mM Glc) došlo, ve srovnání s odpovídajícími kontrolními liniemi, k signifikantnímu poklesu ($p < 0,05$) v inkorporaci ¹³C u stabilních liniích (mi280, mi308), a to v NMX i HPX.

Zároveň je patrná zvýšená bazální inkorporace v 5 mM Glc médiu v NMX oproti 25 mM Glc NMX, to však neplatí v HPX, navíc se jedná o opačnou reakci než u měření inkorporace do citrátu.

4.1.1.2 MDA-MB-231

Reduktivní karboxylace (% 1-¹³C-Citrátu) v buňkách MDA-MB-231 se silencingem IDH2 a v buňkách s náhodnou sekvencí RNA SCR v NMX (sloužících jako kontrolní experiment). Je patrné signifikantní snížení inkorporace u buněk shIDH2 v 5 ($p < 0,001$) i 25 mM Glc ($p < 0,05$) médiu. Jedná se tedy o podobný efekt jako u stabilních HTB-126 linií se silencingem IDH2, ale na rozdíl od HTB-126 nedošlo k signifikantní změně inkorporace vlivem použitého média, tedy při pěstování buněk v 5 či 25 mM Glc.

Zároveň je patrné signifikantní snížení inkorporace do 1-¹³C-Malátu u buněk shIDH2 v 5 ($p < 0,001$) i 25 mM Glc ($p < 0,05$) médiu. Na rozdíl od HTB-126 zde rovněž nedošlo k signifikantní změně inkorporace při pěstování buněk v 5 či 25 mM Glc.

V liniích HTB-126 a MDA-MB-231 je vyjádřena inkorporace v % značeného metabolitu, tedy bez ohledu na totální množství lze porovnat míru RK za experimentálně identických podmínek. Celkově lze o inkorporaci v buňkách MDA-MB-231 říct, že je nižší než v buňkách HTB-126.

V tabulce 1 jsou uvedené koncentrace buněčných metabolitů v linii HTB-126 za normoxických podmínek, v použitém 5 a 25 mM glukózovém médiu. Z výsledků je patrné, že v hyperglykemických podmínkách dochází k signifikantnímu nárůstu koncentrace 2OG a 2HG a k signifikantnímu poklesu koncentrace citrátu. Laktát byl zvýšen jen mírně, zatímco malát takřka vůbec.

Koncentrace metabolitů v mg.10 ⁻⁶ buněk		2HG*	2OG*	LAC	CIT*	MAL
5mM Glc	Průměr	413,87	41,27	68242,07	66,74	116,28
	SD	18,31	3,87	7360,29	6,08	5,34
25mM Glc	Průměr	500,02	95,58	77286,25	43,80	121,73
	SD	5,16	6,03	8655,78	0,35	4,02

Tabulka 1 Průměrné hodnoty (průměr) koncentrace v normoxii a její směrodatné odchylky (SD) 2-hydroxyglutarátu (2HG), 2-oxoglutarátu (2OG), laktátu (LAC), citrátu (CIT) a malátu (MAL) v mg.10⁻⁶ buněk. Použité médium 5 mM glukóza (5mM Glc) a 25 mM glukóza (25mM Glc). * označuje statisticky signifikantní rozdíl s p<0,05 mezi 5 a 25 mM glukózovým médiem.

Syntéza 2-hydroxyglutarátu

Tvorba 2HG v HTB126 prostřednictvím glutaminolýzy byla měřena stejně jako míra RK. Jelikož se jedná o jednoduchou hydrogenaci 2OG, izotopová značka by se tedy nikde neměla ztrácet.

Patrná je inkorporace, respektive procento ¹³C-2HG, které vzniká v NMX i HPX díky glutaminolýze a následné syntéze 2HG. Je zřejmé, že v 5 mM Glc dochází k silnější inkorporaci oproti 25 mM Glc u CTRL (p<0,05) i u buněk se silencingem IDH2 (nesignifikantní (n.s.)), na druhou stranu nedošlo v těchto médiích k významnému zvýšení inkorporace V HPX dokonce došlo při porovnání hypoxické odpovědi s normoxickou k nesignifikantnímu poklesu u linií mi280 a mi308.

Z výsledků vyplývá, že cca 45% 2HG pochází z glutaminolýzy u kontrolních HTB-126 buněk v 25 mM Glc a u 5 mM Glc je syntéza z Gln z 60%, a podobně jako u citrátu a malátu, i zde dochází k signifikantnímu snížení inkorporace po silencingu IDH2 (v 25 i 5 mM Glc, p<0,05).

Zajímavé tedy je, že se nám nepodařilo potvrdit zvýšení inkorporace v prostředí hypoxie, na rozdíl od případu RK, což odráží i absolutní množství 2HG. Zdá se tedy, že formace 2HG není na rozdíl od RK zdaleka tolik závislá na buněčné respiraci a koncentraci O₂.

Množství 2HG v pmol/10⁶ živých buněk v normoxii, hypoxii a v 5 a 25 mM Glc médiu v buňkách HTB-126 - v normoxii došlo k signifikantnímu poklesu množství 2HG v 25 mM Glc u buněk se silencingem IDH2 (p<0,05), v 5 mM Glc byl efekt podobný, ačkoliv u linie mi308 nedošlo k signifikantnímu poklesu, za to u mi280 ano, a to s hodnotou p<0,001. V hypoxii nedošlo k signifikantnímu snížení po silencingu IDH2, za to došlo u všech linií k významnému poklesu koncentrace za těchto podmínek v 5 mM Glc. Signifikantní snížení vyvolané hypoxií bylo patrné v médiu s 25 mM Glc jen u kontrolních buněk s hodnotou p<0,05.

Co se týče % 1-¹³C-1-2HG v buňkách MDA-MB-231 se silencingem IDH2 a v buňkách s náhodnou sekvencí RNA SCR v NMX, je patrné signifikantní snížení inkorporace u buněk shIDH2 v 5 (p<0,001) i 25 mM Glc (p<0,05) médiu. Na rozdíl od HTB-126 nedošlo k signifikantní změně inkorporace při pěstování buněk v 5 či 25 mM Glc.

Výsledky analýzy pomocí metody Western blot, které reflektují koncentraci IDH2 v buňkách HTB126 a MDA-MB-231 po silencingu IDH2 (poměr IDH2/β-actin) je patrná nižší koncentrace IDH2 u mi280 a mi308, přičemž k nejvyšší míře silencingu došlo u mi308 (8x nižší signál oproti kontrole).

Poměr IDH2/ β -actin pro shA u MDA-MB-231 je téměř 5 – 6 x nižší oproti kontrole se Scr, lze tedy rovněž tvrdit, že i v tomto případě došlo k silencingu IDH2.

Vliv inhibitorů respirace na reduktivní karboxylaci

Na základě měření respirace a produkce ATP, které inverzně korelovaly s inhibicí IDH2 (Smolková, et. al., 2015), byl měřen i vliv inhibitorů respirace na RK a syntézu 2HG. Došlo k signifikantnímu poklesu inkorporace u všech metabolitů ($p < 0,05$ pro 2HG, $p < 0,001$ pro citrát a malát) při použití odpřahovače FCCP, který jednoznačně zvyšuje respiraci. Naproti tomu inhibitor ATP syntázy Oligomycin (Oligo) a inhibitor komplexu I Rotenon (Rot) zvýšily signifikantně inkorporaci ^{13}C do všech metabolitů ($p < 0,05$ pro 2HG, $p < 0,001$ citrát a malát). S výjimkou ^{13}C -malátu, který se po ovlivnění oligomycinem nezvýšil.

Ke stejnému výsledku došlo i u buněčné linie SHSY5Y, nelze tedy tvrdit, že se jedná o nahodilý artefakt, ale o fakt, že funkčnost respiračního řetězce inverzně koreluje i s mírou RK a syntézou 2HG, tedy i s aktivitou IDH2. V případě oligomycinu došlo k signifikantnímu nárůstu inkorporace u citrátu a malátu ($p < 0,05$), zároveň došlo i k nesignifikantnímu zvýšení 2HG. U FCCP došlo k signifikantnímu poklesu inkorporace u citrátu ($p < 0,001$), malátu ($p < 0,001$) i 2HG ($p < 0,05$).

Vliv galaktózového média na reduktivní karboxylaci

Dalším fenoménem v nádorech je aglykémie, která, stejně jako hypoxie, potažmo anoxie, souvisí s nedostatečnou angiogenezí a následnou ischemií, díky abnormálně rychle rostoucí buněčné mase. Kontrolní buněčná linie HTB-126 byla vystavena aglykémii – v médiu byla glukóza zaměněna za galaktózu, kterou buňky nedokáží glykolýzou přímo přeměnit na energii. Galaktóza však může být jednodrokově, bez ztráty energie izomerována na glukózu pomocí UDP. Tento proces je možná pomalejší než přímá glykolýza, ale hlavně buňky „necítí“ glukózu v extracelulárním prostředí svými receptory spřaženými s G proteinem (GPCR), což může být příčinou rozdílného - hladového fenotypu, kde dochází k adaptaci buněk na hypoglykémii, respektive aglykémii.

Po použití galaktózy došlo k významnému poklesu reduktivní karboxylace (citrát $p < 0,001$, malát $p < 0,05$) a syntézy 2HG ($p < 0,05$).

Změny reduktivní karboxylace při odlišné koncentraci CO_2

RK byla testována při dvou odlišných koncentracích CO_2 v atmosféře s ekvivalentním množstvím uhlíčitanu v médiu. Potvrdil se význam CO_2 jako nezbytného kosubstrátu pro RK, jelikož míra RK byla významně snížena pro citrát a malát ($p < 0,001$), zatímco pro 2HG nedošlo ke statisticky signifikantní změně.

Pomocí metody Western blot bylo potvrzeno, že nedochází v případě změny koncentrace CO_2 k výrazné změně v expresi IDH2. Nevýznamná změna intenzity jednotlivých signálů byla ověřena analýzou v programu ImageJ.

Silencing isocitrátdehydrogenázy 1

V HTB-126 byl proveden tranzientní silencing IDH1, který měl ověřit, že zdrojem inkorporace je glutaminolýza spojená s RK katalyzovanou IDH2. V těchto buňkách, tedy po silencingu IDH1, byla měřena inkorporace do citrátu, malátu a 2HG.

Bylo vyjádřeno procentuální zastoupení izotopicky značeného citrátu, který pochází z glutaminolýzy a RK. Je zřejmé, že nedošlo k statisticky signifikantní změně po IDH1 silencingu v porovnání s MOCK (kontrola bez přidání plazmidu) a náhodně uspořádané „scrambled“ RNA.

Zároveň je patrné, že tento zásah neovlivnil míru inkorporace u kontrolních HTB-126 nebo u HTB-126 se silencingem IDH2 (siIDH2), kde je opět jednoznačně statisticky signifikantní snížení v 5 i 25 mM Glc ($p < 0,001$) u MOCK a siIDH1.

V případě použití Scr IDH1 došlo k poklesu u miIDH2 jen u linie v 25 mM Glc médiu ($p < 0,001$). U 5 mM Glc miIDH2 nedošlo k statisticky signifikantnímu rozdílu u Scr.

U malátu jsme také nepozorovali žádné výrazné změny po silencingu IDH1, a podobně jako u citrátu, došlo i zde ke statisticky signifikantnímu snížení inkorporace u buněk miIDH2 a to v 5 i 25 mM Glc ve všech ovlivněných liniích.

U 2HG je situace poněkud složitější. V případě kontrolních buněk nedošlo k signifikantním rozdílům mezi transfekcí siIDH1, MOCK a Scr. U linií se silencingem IDH2 (miIDH2) došlo k signifikantnímu poklesu u MOCK a siIDH1 oproti CTRL ($p < 0,05$), u SCR nedošlo k signifikantnímu rozdílu, ačkoliv trend poklesu RK v miIDH2 je zachován. Vliv siIDH1 je však pozorovatelný u buněčné linie miIDH2, která vykazuje po transfekci siIDH1 nižší inkorporaci oproti MOCK a SCR ($p < 0,05$), ovšem tento trend není patrný pro buňky CTRL bez IDH2 silencingu.

4.2 Reduktivní karboxylace v dalších buněčných liniích

Dále byla zkoumána RK, syntéza 2HG a glutaminolýza v buňkách nenádorových, zdravých – tedy zdali vůbec probíhá a v jaké míře. Byly vybrány ušní fibroblasty potkana a potkaní hepatocyty. Dále byla míra inkorporace do daných metabolitů porovnána s vybranými nádorovými liniemi, včetně pankreatických beta buněk INS1E.

Značeného citrátu v nenádorových buňkách není nijak dramaticky méně, dokonce v hepatocytech a fibroblastech dosahuje hladina inkorporace vyšších hodnot než u některých nádorových linií (SHSY5Y, MDA-MB-231 či PaTu 8902). Jako negativní kontrola, potvrzující správnost našeho měření může být použita linie rakoviny tlustého střeva HCT 116 s knock-in mutací R132C, která potvrzuje publikovaná data, prokazující, že v této linii dochází k signifikantnímu poklesu RK (100). Ke stejnému efektu došlo i v případě inkorporace do malátu, ačkoliv zde nebyl pokles zdaleka tak dramatický. V obou případech se však jedná o statisticky signifikantní pokles ($p < 0,001$).

Naproti tomu, procentuální inkorporace do malátu a 2HG, je patrný rozdíl mezi nádorovými a nenádorovými buňkami. Pokud porovnáme nenádorové hepatocyty a fibroblasty s nádorovými liniemi HCT 116, SHSY5Y, MDA-MB-231, Patu 8902, HTB126 a HepG2 a INS1E, dochází v případě malátu k signifikantnímu poklesu ($p < 0,05$) u hepatocytů a fibroblastů a rovněž k signifikantnímu poklesu 2HG ($p < 0,05$) u těch samých buněk.

Význam 2-hydroxyglutarátu v nenádorových buňkách

V dalším výzkumu (po prokázání existence RK a syntézy 2HG ve zdravých buňkách) jsme se zaměřili na význam 2HG. Jako modelové buňky jsme vybrali potkaní fibroblasty, hlavně pro jejich relativně snadnou udržitelnost po několik pasáží a nenádorový charakter. Další zdravé buňky, ke kterým jsme měli přístup, nebylo možné použít pro jejich obtížnou pasážovatelnost, tedy udržitelost. Izolované hepatocyty, stejně tak nenádorové HTB-125, není možné pěstovat delší dobu v *in vitro* podmínkách, a INS1E, pro jejich nejednoznačnou povahu, také nebyly příliš vhodným kandidátem.

Fibroblasty jsme vystavili slabé hypoxii nebo stimulovali jejich růst přidáním séra. Obě tato prostředí měla simulovat některé podmínky, vyskytující se při zánětech, kde částečná hypoxie doprovází vyšší produkci ROS fagocyty a zvýšenou produkci cytokinů a růstových faktorů monocytů podílejících se na proliferaci imunitních buněk.

2HG jako kompetitivní inhibitor 2OG dependentních dioxygenáz, podílejících se mimo jiné na proliferaci či epigenetických změnách, by mohl hrát roli v aktivaci růstu fibroblastů, a proto jsme sledovali poměr 2HG/2OG, stejně jako absolutní koncentraci 2HG.

4.2.1.1 Stimulace růstu sérem a hypoxií

Při stimulaci sérem došlo k nárůstu poměru 2HG/2OG, který byl dále potenciován hypoxií. V obou případech došlo ke statisticky signifikantnímu nárůstu poměru. Šedé sloupce popisují chování neuroblastomových buněk SHSY5Y za stejných podmínek. Je patrné, že odpověď na dané ovlivnění je zcela odlišná – inverzní, ovšem i zde došlo k signifikantním změnám (pro SHSY5Y i fibroblasty platí statisticky signifikantní rozdíly mezi jednotlivými sloupci, $p < 0,001$).

Absolutní množství 2HG koreluje s poměrem pouze v případě fibroblastů, nikoliv SHSY5Y, navíc u těchto nádorových buněk dochází k mnohem menším rozdílům, které jsou v kontextu fibroblastů takřka zanedbatelné. Dochází tedy ke statisticky signifikantnímu nárůstu koncentrace 2HG v izolovaných fibroblastech po stimulaci sérem a HPX (mezi jednotlivými sloupci dochází k signifikantní změně $p < 0,001$).

V kontextu předešlých měření byly ovlivněné fibroblasty podrobeny stejným podmínkám, ale byl měřen jejich přírůstek po 50 hodinách inkubace. Ukázalo se, že v podmínkách bez séra nedošlo skoro k žádnému nárůstu počtu buněk (1,6x oproti množství při nasetí), při stimulaci sérem však množství buněk bylo téměř čtyřnásobné a při hypoxii zhruba sedminásobné. Tato fakta korelují s nárůstem poměru 2HG/2OG i s hodnotou 2HG za stejných podmínek.

Dalším krokem bylo zjistit, zdali samotný 2HG, pokud bude přidán do média, může ovlivnit proliferaci fibroblastů. Použili jsme 2 a 5 mM nederivatizovaný 2HG, který jsme přidávali na 50 hodin k buňkám v 1% séru. Ukázalo se, že míra proliferace fibroblastů koreluje s koncentrací 2HG v médiu, a abychom vyloučili, zdali není tato koncentrace příliš velká, respektive nefyziologická, změřili jsme v buňkách s 5 mM 2HG v médiu koncentraci 2HG po řádném oplachu pelety v PBS. Koncentrace v buňkách se zvýšila 10x, což je zhruba stejné zvýšení jako po stimulaci HPX (Tabulka 2). Poměr 2HG/2OG se zvýšil jen 2x, jelikož množství přidaného 2HG ovlivnilo i množství 2OG (Tabulka 2). Byl měřen i citrát, malát, fumarát a laktát, u kterých došlo k poklesu hladin po inkubaci s 2HG vyjma citrátu (neuveďeno). Pro zvýšení citlivosti samotného experimentu bylo buňkám přidáno jen 1% sérum ve všech koncentracích 2HG.

C_{2HG} v médiu	n_{2HG} · 10⁻⁶ buněk ± SD	n_{2OG} · 10⁻⁶ buněk ± SD	n_{2HG}/n_{2OG} ± SD
0 mM	193,3 ± 16,8 mol	176,9 ± 33,8 mol	1,09 ± 0,12
5 mM	1844,3 ± 68,2 mol	913,7 ± 4,8 mol	2,02 ± 0,09

Tabulka 2 Látkové množství 2HG a 2OG a jejich poměr po ovlivnění fibroblastů 5 mM 2HG v médiu.

U neuroblastomových buněk došlo k podobnému efektu jako u fibroblastů pouze v případě buněk pěstovaných v 1% séru, kde byl nárůst buněk nejnižší, ovšem v hypoxii nedošlo k potenciaci růstu jako u fibroblastů, tudíž k nejvyššímu nárůstu buněčné hmoty došlo v NMX v 10% séru. Tento výsledek sice nekoreluje s poměrem 2HG/2OG, ovšem překvapivě koreluje s koncentrací 2HG v buňkách při těchto podmínkách.

Dalším krokem bylo potvrzení změny růstu fibroblastů měřením buněčného cyklu. Trendy při stimulaci růstu sérem, HPX a 2HG byly zachovány. 2HG byl přidáván v koncentraci 3 mM jednak pro úsporu komerčně dodaného 2HG, a také proto, že došlo k významnému nárůstu buněčné hmoty už při 2 mM 2HG. V případě buněčného cyklu byl zachován trend, který byl jednoznačný u růstu buněk.

HPX snížila % buněk v G1/G0 fázi, ale zvýšila množství v S a G2 fázi. V buňkách bez séra naopak došlo ke zvýšení množství buněk v G1/G0 a snížení v S a G2 fázi. Přídavek 2HG k buňkám s 1% FTS je nejvíce znát v S fázi, kde je jasně patrné zvýšení buněk pod tímto treatmentem oproti samotným buňkám s 1% sérem.

Definitivním potvrzením účinku 2HG a použitých podmínek se pro nás stala metoda, při které jsme díky inkorporaci bromodeoxyuridinu mohli sledovat míru replikace DNA, jež se měnila v závislosti na

použitých podmínkách. Výsledky potvrdili předchozí měření, kde došlo po přidavku 2HG k nárůstu proliferace, tedy úměrně koncentraci. Zároveň jsme tento výsledek potvrdili i v nádorových buňkách SHSY5Y. V hypoxii došlo stejně jako v předchozích experimentech k stimulaci proliferace u fibroblastů a v médiu bez séra ke zpomalení proliferace. U SHSY5Y došlo ke zpomalení proliferace v HPX i v médiu bez séra, přičemž nedostatek séra při pěstování těchto nádorových buněk neměl na pokles míry proliferace tak dramatický vliv jako HPX.

Výsledky analýzy pomocí metody Western Blot fosforylovaného S6 proteinu a HIF1 α u buněk SHSY5Y naznačují vliv 2HG. V tomto experimentu jsme se zaměřili na možné cíle, které by zvýšené hladiny 2HG mohly ovlivňovat na molekulární úrovni, nebylo však možné měřit tyto výsledky na fibroblastech, protože nebyla k dispozici potkaní protilátka. Nejprve jsme zkoumali míru aktivace mTORC1, který je známý jako regulátor buněčného dělení či proliferace. Měřili jsme míru fosforylace ribozomálního proteinu S6. Přidáním 2HG však nedošlo k zvýšení aktivity mTORC1, tedy k fosforylaci S6 proteinu. Dále jsme zkoumali druhý možný cíl 2HG – HIF1 α . Zde jsme však nebyli schopni detekovat HIF1 α ze samotného vzorku, jelikož se jeho podjednotky po izolaci destabilizovali. Proto jsme k buňkám přidávali CoCl₂, který stabilizuje HIF1 α do té míry, že jsme byli schopni ho pomocí této metody detekovat a kvantifikovat. Po přidání 2HG dojde ke zvýšené stabilizaci HIF1 α . Jako pozitivní kontrolu jsme použili dvě koncentrace CoCl₂ a můžeme vidět, že v závislosti na koncentraci činidla vzroste míra stabilizace HIF1 α , která zároveň signifikantně vzroste po přidání 2HG.

Dochází k významným změnám proliferace po ovlivnění 2HG nejen u fibroblastů, ale i u neuroblastomových buněk SHSY5Y.

Na základě dat změřených na fibroblastech, kde docházelo v médiu s normální glykemií po přidavku 2HG k posunu hladin metabolitů (malát, fumarát, laktát) směrem dolů, byl stejný experiment zopakován u neuroblastomů. Zároveň ke sledování vlivu 2HG nebylo využito jen 50 hod, ale i krátké 8 hodinové ovlivnění.

Ukázalo se, že v tomto médiu dochází po 8 i 50 hod od přidavku 2HG k statisticky signifikantnímu poklesu množství všech metabolitů, vyjma 2HG – logicky –, jehož vysoké množství z média prostupuje dovnitř buněk a způsobuje signifikantní zvýšení.

Po 50 hod sice zůstávají zachovány trendy osmihodinového intervalu, ovšem koncentrace malátu a fumarátu přes delší inkubaci klesla nesignifikantně.

Stejný experiment byl proveden v hypoglykemickém médiu bez glutaminu, kde byla předpokládána právě vlivem těchto podmínek snížená buněčná respirace. Tento fakt potvrzuje experiment, kde po krátkém 8 hod přidavku 2HG dochází k zvýšení hladin všech metabolitů, s výjimkou citrátu a 2OG. Po 50 hod od přidavku 2HG pak dochází k poklesu všech metabolitů oproti kontrolám - statisticky signifikantní pokles je patrný u 2OG, laktátu a malátu. U citrátu a fumarátu sice dochází k snížení, ale změna není signifikantní. Lze tedy předpokládat, že 2HG aktivuje respiraci i ve ztížených podmínkách pro buněčnou proliferaci.

Se změnou respirace se jednoznačně prolíná i změna produkce ROS. Pro jednoznačnost výsledku byla změřena produkce mitochondriálního superoxidu v buňkách, jež byly podrobeny posledně zmíněným podmínkám - tedy kultivace za hypoglykémie, bez glutaminu. Výběr podmínek nebyl náhodný a byl zvolen právě proto, že zde docházelo k takřka opačným jevům po krátké a dlouhé inkubaci buněk s 2HG. Ukázalo se, že dochází v obou případech k signifikantně vyšší produkci superoxidu po přidavku 2HG, ačkoliv nebyl pozorován významný rozdíl mezi 8 a 50 hodinami od přidavku 2HG.

4.2.1.2 Porovnání poměru 2HG/2OG v různých buňkách

Dále bylo zkoumáno množství 2HG v různých buněčných liniích. Bylo měřeno 5 nenádorových a 6 nádorových buněčných linií. Samotné množství 2HG o ničem nevyovídalo a lišilo se mezi liniemi nezávisle na druhu tkáně či stupni transformace – porovnáváme-li absolutní koncentraci v nahodilém výběru nádorových vs. nenádorových buněk (nesignifikantní statistické změny). Vidíme, že u nádorových buněk nedochází obecně k dramatickému nárůstu 2HG (vyjma nádorových HTB-126), i když s výjimkou nenádorových HTB-125 se dá tvrdit, že je koncentrace 2HG v nádorových buňkách vyšší. Na první pohled se však jeví koncentrace 2HG jako zdánlivě nesouvisející s fenotypem či genotypem buňky (nejasná hranice mezi nádorovými a nenádorovými liniemi). Avšak v případě porovnání podobně diferencovaných tkání lze zřetelně odlišit nádorové a nenádorové buňky. Jedná se o dvojici HTB-125 vs. HTB-126, potkaní hepatocyty a lidské HepG2, RTG indukované INS1E vs. PaTu 8902 (zde se však jedná od dva odlišné fenotypy). U všech zmíněných dvojic dochází k nárůstu koncentrace po transformaci buňky, respektive u ryze nádorových buněk. Dále můžeme zmínit i staré vs. mladé fibroblasty, kde u starších je 2HG signifikantně vyšší, což je pravděpodobně způsobeno nastřádáním různých mutací. Ve všech uvedených případech se jedná o statisticky signifikantní rozdíl ($p < 0,001$).

Na druhou stranu poměr látkového množství 2HG/2OG zřetelně ohraničuje rozdíl mezi nádorovou a nenádorovou linií - včetně INS1E. Poměr 2HG/2OG je u zdravých buněk menší než 2, nebo spíše bližší 1, zatímco poměr u všech nádorových linií je vyšší než 5. Signifikantně se liší obě skupiny z hlediska poklesu hodnoty ($p = 10^{-8}$) a i z hlediska rozptylu jednotlivých výsledků ($p = 1,2 \cdot 10^{-18}$).

Zároveň lze pozorovat pokles poměru 2HG/2OG mezi dvěma různě starými liniemi fibroblastů. Dochází k více jak dvojnásobnému poklesu u mladých fibroblastů oproti starým, což koreluje i s hodnotou absolutní koncentrace 2HG v těchto buňkách. V souvislosti s tím byl změřen buněčný cyklus v těchto buňkách, kde se ukázalo, že dochází jednoznačně i k lepší proliferaci starších fibroblastů s vyšší koncentrací 2HG. Procentuální zastoupení starých fibroblastů nacházejících se v S a G2 fázi bylo signifikantně vyšší oproti mladým fibroblastům, spolu se signifikantním poklesem počtu starých fibroblastů v G1/G0 fázi.

4.2.1.3 Poměr 2HG/2OG v orgánech vyjmutých z potkanů

Zajímavým fenoménem se zdá být nárůst poměru 2HG/2OG v orgánech vyizolovaných z živých potkanů. Zde tyto poměry dosahují obdobných hodnot jako v nádorových buňkách *in vitro*, což je samo o sobě zajímavé. Původně jsme se v rámci hypotézy snažili porovnat orgány, ve kterých dochází k různé proliferaci a obnově buněk a najít korelaci k poměru 2HG/2OG, což se nám nepodařilo. Předpoklad byl takový, že ve slezině, kde probíhá tvorba lymfocytů, bude díky podmínkám proliferace poměr 2HG/2OG vyšší a v srdci či v mozku naopak nízký. Koncentrace 2HG korelovala v jednotlivých orgánech s poměrem 2HG/2OG.

Toto měření nás ovšem upozornilo na odlišnou hodnotu 2HG/2OG *in vivo* vs. *in vitro* pokusů a zároveň na artefakt, který vznikl při porovnání nádorové HepG2 linie s přímo izolovanými hepatocyty (nikoliv celými játry).

Docházelo zde k velkým rozdílům v poměru 2HG/2OG, přičemž **zvýšení** poměru v hepatocytech vůči HepG2 bylo velmi signifikantní ($p = 7,9 \cdot 10^{-4}$). V případě, kdy však byly izolované hepatocyty kultivovány po 24 hodin ve stejném médiu jako HepG2, došlo k signifikantnímu **poklesu** oproti HepG2 ($p = 3 \cdot 10^{-6}$) a poměr odpovídal kultivovaným zdravým buňkám.

Skutečná koncentrace 2HG neodpovídá jednotlivým poměrům a je patrné jasné signifikantní zvýšení koncentrace 2HG v nádorových buňkách (HepG2), což odpovídá předchozím výsledkům, ze kterého zcela jasně vyplývá, že koncentrace 2HG je vyšší u nádorových buněk, ačkoliv pouze za předpokladu, že porovnáme typově podobné zdravé či nádorové buňky. Můžeme rovněž vidět signifikantní zvýšení koncentrace 2HG u hepatocytů, izolovaných přímo z potkaních jater oproti hepatocytům kultivovaným minimálně 24 hodin v růstovém médiu.

4.2.1.4 Využití 2HG v klinické praxi

Výsledky (hladina 2HG) čtyř skupin sledovaných pacientek s nádorem prsu a jedné kontrolní skupiny. U všech skupin byla měřena koncentrace 2HG v moči. Pacientky v remisi, ve stádiu 3 a stádiu 4 (1 a více metastáz) byly porovnávány se zdravými ženami. Jedná se o pilotní studii a předběžné výsledky, které však účinně naznačují význam 2HG jako možného markeru nádorového onemocnění, v našem konkrétním případě karcinomu prsu.

Zdravé kontroly mají nejnižší hladinu 2HG v moči. Se stádiem nemoci a počtem metastáz roste i koncentrace 2HG, výjimku tvoří pacientky v remisi, které vykazují vyšší hladiny než pacientky ve stádiu 3.

Vzorky moči byly měřeny současně se vzorky krve (séra), ovšem v séru nebyl patrný žádný určující trend, který by jednoznačně definoval dané skupiny.

5 Diskuze

Reduktivní karboxylace byla prokázána původně v hnědých tukových buňkách, kde dochází přednostně ke generaci tepla na úkor syntézy ATP (75) a později byla prokázána v některých nádorových buňkách (101).

Reduktivní karboxylaci (RK) jsme prokázali v buňkách, ve kterých nebyla doposud zkoumána. Metodicky jsme se nechali inspirovat již dříve popsanými postupy zahrnující izotopické značení (101), ovšem pro naše potřeby bylo nutné model inkorporace zásadně přepracovat. Cílem bylo spolehlivě odlišit RK od dopředného toku, aniž by byla potřeba využít NMR či složité a nákladné druhy izotopického značení. Instrumentální metodou GC-MS, kterou jsme měli k dispozici, nebylo možné odlišit enantiomery, ani polohu izotopu, pouze počet značených atomů. Díky metodě, která se zakládala na znalosti a implementaci mechanismu působení enzymů Krebsova cyklu, bylo možné spolehlivě odlišit právě míru RK od oxidačního směru Krebsova cyklu.

Podařilo se nám prokázat v našich nádorových liniích RK i v normoxii, a míra RK odpovídala hodnotám naměřených v buňkách melanomu (102).

Předpokládali jsme, že v 5 mM glukózovém médiu v NMX, které je z hlediska glykémie fyziologičtější, by však měla být RK nižší než v 25 mM Glc médiu, z toho důvodu, že pro rychle proliferující nádorové buňky by glykolýza 5 mM glukózy + glutaminolýza nemusela dostatečně pro tvorbu substrátů RK a dopředné dráhy zároveň – že by v normoxii měla být upřednostněna tvorba ATP skrze OXPHOS na úkor RK. Naopak v 25 mM Glc byla považována za dostatečně vysokou pro poskytnutí dostatku intermediátů Krebsova cyklu pro oxidační fosforylaci, tím pádem by mohl dopředný směr fungovat nezávisle na glutaminolýze, která by v tomto případě byla plně využita pro RK. Tento fakt se potvrdil v případě citrátu u buněk HTB-126, u buněk MDA-MB-231 sice došlo v případě citrátu k podobnému trendu, nicméně nedošlo k dramatickému navýšení, vyjma buněk se silencingem IDH2. U malátu a 2HG došlo u linie HTB-126 k opačnému efektu a u MDA-MB-231 byl stejný jev pozorován u malátu, ale ne u 2HG. Jednoznačně tedy nelze potvrdit hypotézu, že by se inkorporace do metabolitů reverzní dráhy RK a 2HG zvýšila v hyperglykemickém prostředí. V kontextu s těmito výsledky je možné navrhnout, že by rozdíly mezi 5 a 25 mM Glc médii nebyly markantní nebo vůbec znatelné, pokud by byla dostatečně aktivována glutaminolýza a dráha RK. Tato hypotéza se však v celkovém kontextu také ukázala jako zavádějící. Tedy tehdy, kdy byly změřeny i absolutní koncentrace metabolitů.

V těchto podmínkách v HTB-126 byla změřena koncentrace laktátu, která však nevykazovala signifikantní rozdíly, ačkoliv zde došlo k významnému zvýšení koncentrace 2OG a posléze i 2HG, dále k snížení citrátu a mírnému zvýšení koncentrace malátu (Tabulka 1). Hodnoty malátu, citrátu a 2HG však inverzně korelují s mírou inkorporace. Lze tedy tvrdit, že jejich změny jsou dílem glykolýzy. Glutaminolýza se tím pádem jeví jako relativně neměnná anaplerotická dráha, která systematicky zásobuje Krebsův cyklus a zvýšení koncentrace díky glykolýze má za následek nižší inkorporaci. Tento efekt nejpříjemněji vysvětluje danou problematiku, neboť zde dochází k „naředění“ signálu ¹³C-

metabolitu, tedy smísení stejného intermediátu pocházejícího jednak z $1\text{-}^{13}\text{C}$ -glutaminu a jednak z neznačené glukózy, případně z jiné anaplerotické dráhy. Příčina vcelku stabilní glutaminolýzy může být zdůvodněna již dříve popsanou upregulací c-myc v buňkách prsního karcinomu (45), která zároveň upreguluje glutaminolýzu (26, 68).

Z výsledků je zároveň patrné, že dochází k různé inkorporaci mezi jednotlivými metabolity – inkorporace do malátu byla nejnižší, zatímco do 2HG nejvyšší. Míra inkorporace závisí na mnoha proměnných, včetně již zmíněné míry glykolýzy a jiných anaplerotických drah. Nejvyšší inkorporace do 2HG je dána pravděpodobně přímou cestou vzniku, jelikož 2HG vzniká přímou redukcí 2OG, ačkoliv je potřeba brát v potaz i jiné enzymy zodpovědné za syntézu 2HG, kde však nemusí nezbytně figurovat značený ^{13}C -2OG. V savčích buňkách je R-2HG také produkován z 5-aminolevulinátu (83). 5-aminolevulinát (prekursor hemu) je oxidačně degradován a konvertován na 2HG za přispění glutathion-dependentní glyoxylázy izoformy 1 (GLO1) a 2 (HAGH) (84). V mitochondriích přispívá “hydroxyacid-oxoacid-transhydrogenase” (HOT, nebo ADHFE1, EC 1.1.99.24) k syntéze R-2HG z 2OG, zatímco současně konvertuje 4-hydroxybutyrát na semialdehyd sukcinátu (85). HOT tedy soutěží s IDH2 o 2OG. Nedávno bylo také zjištěno, že lidská fosfoglycerátdehydrogenáza (EC 1.1.1.95) formuje R-2HG z 2OG (86), a dále laktátdehydrogenáza-A a mitochondriální malátdehydrogenáza v téměř anoxických podmínkách produkuje S-2HG, což podporuje malignitu podobně jako R-2HG (87). Výše popsané dráhy vzniku 2HG však nemusí být nutně přítomné v námi použitých buňkách. Nicméně s ohledem na mechanismus reakce, tedy fakt, že 2HG vzniká redukcí 2OG a citrát vzniká takřka přímo díky RK z 2OG, lze říci, že IDH2 v těchto buňkách syntetizuje podstatnou část 2HG, ačkoliv v celkovém měřítku menšinou, ovšem už se nepodílí v takové míře na reverzním vzniku citrátu. Navíc je z výsledků patrné, že dochází k odlišné inkorporaci mezi jednotlivými buňkami prsního karcinomu, což je pochopitelně dáno neidentickým genotypem či fenotypem.

Naše data tedy potvrzují, že míra RK, včetně syntézy 2HG, souvisí s aktivitou IDH2 (54). Snížená inkorporace po silencingu IDH2 v daných buněčných liniích jednoznačně poukazuje na významnost IDH2, zatímco silencing IDH1 ukazuje, že enzym IDH1 se v našem modelu nepodílí na míře inkorporace do citrátu a malátu.

Skutečnost, že se IDH1 podílí na syntéze 2HG je pravděpodobně způsobena různými známými bodovými mutacemi (103 – 107), ačkoliv již bylo prokázáno, že i nemutovaná IDH1 a 2 se může podílet na produkci 2HG (44).

V našem případě nebyla prokázána mutace IDH2 ani IDH1 u buněk HTB-126 (30). To, že se IDH1 podílí na syntéze 2HG v buňkách HTB-126 je nový fakt, který potvrzuje ojedinělý nález, že nemutovaná IDH1 přispívá v nižší míře k syntéze 2HG (44).

Hypoxická odezva byla měřena pouze u buněk HTB-126. Hypoxie zvyšuje aktivitu nebo expresi IDH2 (108, 109). V případě hypoxie došlo k zvýšení inkorporace u citrátu u kontrol i buněk se silencingem IDH2, přičemž byl dodržen nižší trend inkorporace právě v případě silencingu. V případě malátu byl stejný trend dodržen jen u 25 mM Glc, u 5 mM došlo k zvýšení v kontrolách, ale v případě silencingu nedošlo ke změně, ba dokonce byla inkorporace mírně snížená. Tento jev lze vysvětlit podobně jako vliv hyperglykemických podmínek, tedy snížením % ^{13}C díky hromadění metabolitů z jiných zdrojů. Pyruvát, který se může v podmínkách hypoxie, jež je spjata se stabilizací HIF1 α , hromadit díky zvýšené glykolýze (110), může být následně přeměněn pomocí pyruvát karboxylázy na oxalacetát, který reverzní reakcí s malát dehydrogenázou vytváří malát. Takto vzniklý malát zvýší procentuální zastoupení neznačeného malátu, tedy sníží relativní míru inkorporace. Nicméně snížení ^{13}C -malátu v HPX bylo pozorováno jen ve stabilních liniích mi280 a mi308, které mohou mít odlišný metabolismus. Fakt, že se tento výsledek neobjevil u kontrolních HTB-126 svědčí spíše o tom, že se možná jedná o náhodný artefakt.

Inkorporace do 2HG nebyla v hypoxii vyšší, ačkoliv už byla v jiných publikacích potvrzena vyšší produkce tohoto metabolitu v HPX (75), což může souviset s vyšší aktivitou nebo expresí IDH2 (108, 109) nebo jiných enzymů (75). Vyšší produkce však byla zjištěna v koncentraci kyslíku 0,5% (111, 112), proto je pravděpodobné, že v případě 2HG je potřeba téměř anoxických podmínek pro zvýšení jeho syntézy. To může být způsobeno celkově vyšší produkcí tohoto onkometabolitu u nádorových buněk (54), jež je hypoteticky příčinou nižší odezvy na mírnou hypoxii, tedy že změny v produkci 2HG

vlivem prostředí se mohou smýt díky obecně masivní produkci tohoto metabolitu nádorovými buňkami.

Proto byl na HTB-126 linii zkoumán vliv inhibitorů, respektive modifikátorů respiračních komplexů: oligomycinu, FCCP, rotenonu, které by měli simulovat konkrétní dysfunkce respiračního řetězce. K tomu nás navedly výsledky měření respirace na těchto buněčných liniích se silencingem IDH2, které vykazovali vyšší respiraci a produkci ATP. Oxidativní fosforylace tedy inverzně korelovala s mírou RK (54).

Při použití jednotlivých modifikátorů byl potvrzen efekt respirace na RK. Odpřahovač FCCP, poprvé popsán v 60. letech minulého století (113), který narušuje syntézu ATP a mění membránový potenciál, také způsobuje zvýšení respirace. V našem případě zvýšená respirace byla příčinou nižší RK, spolu s nižší syntézou 2HG. RK v případě použití FCCP klesla téměř na nulu a 2HG syntéza byla významně snížena. Obráceně tomu bylo při použití rotenonu a oligomycinu, jež způsobují inhibici komplexu 1 (rotenon) a ATP syntázy (oligomycin). Došlo k významnému zvýšení RK i syntézy 2HG. Stejně výsledky byly zjištěny i v neuroblastomové linii SHSY5Y, takže se s největší pravděpodobností nejedná o atypickou reakci buněk HTB-126. Navíc v buňkách SHSY5Y dochází po použití rotenonu k nárůstu, potažmo kumulaci S-2HG, díky inhibici S-2HG dehydrogenázy, způsobené právě rotenonem (114). Z těchto výsledků a z výsledků získaných v HPX lze tedy jasně vyčíst efekt míry respirace, který ovlivňuje míru RK a syntézu 2HG.

Vliv galaktózového média na RK, respektive odnětí glukózy, byl další jev, který byl zkoumán v buňkách HTB-126. Významné snížení inkorporace do všech metabolitů lze vysvětlit změnou energetické bilance způsobené odebráním glukózy. V tomto médiu si nádorové buňky nemohou syntetizovat ATP pomocí glykolýzy, tudíž je nutné, aby si buňky syntetizovaly ATP oxidativní fosforylací. Z toho důvodu pravděpodobně převládá dopředný tok Krebsova cyklu, čemuž odpovídá právě snížení RK. Vliv galaktózy byl zkoumán i v jiných studiích například na HeLa buňkách, kde bylo zjištěno, že po ovlivnění galaktózou se zdvojnásobí buněčná respirace (115).

Dalším aspektem, který byl studován, je hypokapnie, tedy vliv nižší koncentrace CO_2 pro kultivaci buněk. Je známo, že některé nádorové buňky, například transformované z buněk tlustého střeva, mají vyšší invazní schopnost v podmínkách vyšší koncentrace CO_2 (116). Za předpokladu, že RK používá oxid uhličitý jako substrát, byla zkoumána míra RK v nižší koncentraci CO_2 . Reduktivní karboxylace v atmosféře CO_2 je sice běžnou reakcí v organické chemii (117), ale efekt CO_2 na RK v živých biologických systémech, jako jsou právě nádorové buňky, nebyl dosud podrobněji studován. Podle předpokladu bylo zjištěno, že RK významně klesla v HTB-126 v nižší koncentraci CO_2 , na druhou stranu však nebyla změněna syntéza 2HG. Logickým důvodem je fakt, že 2HG nepotřebuje pro svou syntézu CO_2 . Buňky MDA-MB-231 nebyly testovány na inkorporaci do RK, ale stejně jako v HTB-126 v nich bylo změřeno množství IDH2 po změně atmosféry CO_2 . Zcela prokazatelně nedošlo k overexpresi genu IDH2 nebo ke snížení množství IDH2. Výsledky tedy potvrzují teorii, že CO_2 může fungovat jako substrát pro RK a jeho nižší koncentrace může tuto reakci významně snížit.

V naší druhé publikaci byl zkoumán 2HG, jeho vliv na buněčné dělení, případně jeho hladiny po ovlivnění sérem či hypoxií v potkaních fibroblastech – zdravých buňkách, které kromě výhody, že nejsou transformované, ještě skýtají další výhodu, a tou je jejich relativně dobré dělení a pěstování *in vitro*.

Nejprve však byla zjištěna míra RK a následně míra syntézy 2HG pomocí izotopického značení, aby byla vůbec potvrzena vhodnost tohoto modelu. K tomuto pokusu byly posléze přidány další buněčné linie, aby se míra inkorporace dala porovnat i s jinými druhy nádorových či zdravých buněk za stejných podmínek. RK byla sice prokázána v mnoha nádorových liniích a v hnědém tuku (35, 128 – 130, 110, 112, 131, 132), stejně tak syntéza 2HG, u které donedávna platilo, že probíhá jen v buňkách s mutací IDH2 nebo IDH1 (123), nicméně obě tyto metabolické dráhy v primárních fibroblastech, potažmo zdravých buňkách, jsou jen málo prozkoumané (66). Nehledě na to, že význam 2HG byl dlouhou dobu skryt.

Prokázali jsme, že 2HG může být syntetizován i ve zdravých buňkách – potkaních fibroblastech a hepatocytech, a v lidských HTB-125, stejně tak v nich může probíhat RK, a to navzdory předpokladům, že jsou obě dráhy charakteristické hlavně pro nádorové buňky. Byť se jedná z našeho

pohledu o překvapivé zjištění, výsledky jsou v souladu s článkem zabývajícím se lidskými fibroblasty, kde byla samotná RK potvrzena u lidských fibroblastů (66).

RK byla prokázána ve všech použitých buněčných liniích, stejně tak syntéza 2HG, vyjma buněk HCT 116 s knock-in mutací IDH1 R132C, kde bylo již dříve prokázáno, že díky mutaci dochází k potlačení RK (100).

V paletě použitých buněčných linií bylo tedy 7 nádorových linií, 3 zdravé typy buněk (potkaní fibroblasty, hepatocyty a HTB-125) a 1 potkaní pankreatická buněčná linie pocházející z RTG iniciovaného insulinomu – INS1E (benigní) (124, 125). Fibroblasty a hepatocyty oproti nádorovým buňkám vykazovaly signifikantně sníženou inkorporaci do malátu (zde u INS1E také signifikantní pokles) a 2HG, avšak už nedošlo k signifikantní změně v inkorporaci do citrátu.

Z výsledků lze vyčíst, že inkorporace do citrátu je u INS1E nejnižší ze všech studovaných linií, vyjma HCT 116 R132C.

Lze tedy předpokládat, že tyto tři buněčné linie (hepatocyty, fibroblasty a INS1E) mají RK i syntézu 2HG nižší, rovněž i snížený export citrátu do cytosolu, předcházející právě vzniku malátu. INS-1E mají navíc vyšší respiraci a jsou dobře spřažené (126), což může mít za následek nižší RK a syntézu 2HG. Toto potvrzují i naše výsledky, i když u značeného citrátu nedošlo k signifikantní změně. Dle látkového množství 2HG zmapovaného v těchto buněčných liniích lze rovněž tvrdit, že v těchto třech buněčných liniích dochází k nižší syntéze 2HG. Porovnání syntézy 2HG ve zdravých a nádorových buňkách bylo publikováno částečně i v naší předchozí práci mezi buňkami prsního karcinomu HTB-126 a zdravými HTB-125. Koncentrace byla signifikantně nižší (54), stejně jako je tomu v tomto případě při porovnání lidské nádorové HepG2 linie a potkaních hepatocytů.

Náše druhá publikace byla však zaměřena především na význam 2HG ve zdravých buňkách, jeho vliv na proliferaci – vycházeli jsme z nedávných publikací na nádorových buňkách, které se zabývají právě epigenetickými změnami ve spojení s proliferací a 2HG, a zejména s faktem, že 2HG kompetitivně inhibuje 2OG dependentní dioxygenázy (2OG-DD), což způsobuje široké genomové změny histonů a metylaci DNA (92). 2OG-DD se podílí na udržení tumorigenních vlastností nádorových buněk s mutací IDH, produkující vysoké hladiny 2HG (127). Navíc, 2HG se může v lidských astrocytech podílet na proliferaci tím, že aktivuje EGLN, čímž snižuje hladiny HIF (96). Na základě faktu, že 2HG může soutěžit o vazebné místo právě na 2OG-DD, byl krom absolutní koncentrace 2HG zohledněn i poměr 2HG/2OG, který podle našeho názoru mnohem lépe vypovídá o možných vazebných interakcích a fyziologických změnách.

Nejprve byl zkoumán vliv některých parametrů, které se nedílně podílejí i na hojení ran. Pro tyto účely byla zvolena hypoxie, která při poranění hraje významnou roli a stimuluje vazodilataci v okolí poškozené tkáně. Kromě toho může hypoxie podobně jako fibrinová výplň chronického poranění zvýšit produkci ROS. Stimulace sérem měla simulovat výlev růstových faktorů a dalších látek podílejících se na proliferaci nové tkáně, angiogenezi a množení imunitních buněk (144, 145).

Poměr 2HG/2OG byl signifikantně zvýšený po stimulaci sérem, navíc byl 2HG/2OG mnohem vyšší po stimulaci sérem a HPX. Z výsledků je možné vyvodit, že při zvolených podmínkách, kde obecně dochází kooperací mnoha faktorů k proliferaci fibroblastů i lymfocytů (128), dojde i k prudkému zvýšení koncentrace 2HG. Inverzně k tomu se jevila odpověď neuroblastomových buněk SHSY5Y, které pravděpodobně pro svou rakovinnou povahu reagovaly zcela odlišně a poměr 2HG/2OG se po stimulaci sérem a následně HPX snížil. Absolutní množství 2HG se sice po stimulaci FTS nesignifikantně zvýšilo, ale po vystavení buněk hypoxii naopak došlo k poklesu téměř na původní hodnotu, tedy k nesignifikantní změně oproti normoxickým podmínkám. Snížení množství 2HG v neuroblastomech po stimulaci HPX bylo paradoxní a v nesouladu s nedávno zveřejněnými výsledky na stejných buňkách, avšak publikovaná data, která v hypoxii demonstrovala nárůst hladin 2HG, byla získána v mnohem hlubší hypoxii – 0,5% O₂ (129). Můžeme se domnívat, že nádorové buňky reagují až na mnohem hlubší hypoxii než zdravé buňky, jsou méně citlivé (již bylo diskutováno výše u RK). Podobné výsledky, kdy se neprojevila změna v produkci 2HG v 5% HPX, byly *de facto* zjištěny i v buňkách HTB-126 (54).

V další části byly sledovány přírůstky buněk ve stejných podmínkách, ve kterých stoupala koncentrace 2HG ve fibroblastech, respektive poměr 2HG/2OG. Bylo zjištěno, že v podmínkách

stimulujících syntézu 2HG dochází i k rychlejšímu růstu fibroblastů. Na druhou stranu, u neuroblastomů nekoreluje poměr 2HG/2OG s růstem, ačkoliv skutečná koncentrace 2HG ano. Je tedy otázkou, jestli právě 2HG nebo samotný poměr zodpovídá za tyto změny, proto byl fibroblastům přidáván 2HG ve dvou koncentracích, při kterých docházelo k rychlejší proliferaci přímo úměrně se stoupající koncentrací.

V případě buněčného cyklu došlo při přidavku 2HG k zvýšení procenta buněk pouze v S fázi. Odpověď na přidavek 2HG tedy může být pomalejší než u HPX, ale významná.

Hypoxie zcela jednoznačně zvyšuje proliferaci, přičemž se pravděpodobně jedná o rychlou nebo komplexní odezvu buněk. Dochází zde k očividným změnám v jednotlivých fázích buněčného cyklu, které jednoznačně poukazují na vyšší proliferaci, což koreluje s počtem buněk v daných fázích. Tento jev je sice dobře prozkoumaný (130), ale dosud nebyl u zdravých buněk spojován s produkcí 2HG.

Vysvětlení slabší odezvy buněk na přidání 2HG, tedy že nedošlo za stejný čas k postoupení buněk do G2 fáze jako v hypoxii, lze vysvětlit faktem, že tyto buňky byly kultivovány v médiu bez séra. Je známo, že proliferace fibroblastů je aktivována právě přítomností séra (131). Tento faktor hraje roli i v celkové odezvě buněk a v buněčném růstu, což potrzují i růstové křivky, na kterých je patrné, že při HPX s 10% FTS dojde k sedminásobnému zvýšení počtu buněk, ale bez séra, byť s přidavkem 5 mM 2HG, je jejich počet poloviční, přestože jsme GC-MS analýzou zjistili obdobný nárůst 2HG v HPX i po přidavku 2HG.

Pro úplnost však byla pomocí BrDU změřena ještě proliferace fibroblastů i SHSY5Y za podmínek, které byly popsány výše, s tím rozdílem, že i u neuroblastomových linií byl zkoumán přidavek 2HG do média s 1% sérem. Výsledky jednoznačně rozhodly, že 2HG má v případě proliferace významný vliv, jelikož přidavek 2HG do média u obou buněčných linií zvýšil replikaci DNA a proliferaci. Zbylá data jsou konzistentní s výsledky růstu buněk i buněčného cyklu. Bazální hladiny 2HG naměřené po stimulaci sérem a v prostředí hypoxie u SHSY5Y a fibroblastů rovněž korelují se zvýšenou mírou replikace DNA.

Jak už bylo zjištěno, intracelulární koncentrace 2HG se po jeho přidavku do média zvýší asi 10x, což se samo o sobě promítne i na koncentraci 2OG. Tento jev byl v jiných studiích potvrzen v několika nádorových liniích, kde docházelo k rovnováze mezi 2HG a 2OG (132 – 133). Nabízí se otázka, jestli vzájemné reverzibilní propojení 2HG a 2OG, které způsobí zvýšení 2OG po přidání 2HG, nemůže ovlivnit proliferaci ve smyslu zvýšení koncentrace ostatních intermediátů Krebsova cyklu, které by mohlo pozitivně ovlivnit i aktivitu mTOR (134). Navíc, desetinásobné zvýšení se může jevit jako veliké, ovšem koncentrace 2HG je stále ve fyziologickém intervalu nádorových buněk (146) a navíc u fibroblastů kultivovaných v normoxii vs. hypoxii byl takovýto výkyv běžný. Poměr 2HG/2OG byl přibližně dvojnásobný, což odráží právě propojení a zpětnou vazbu mezi 2HG – 2OG. Z našich výsledků na fibroblastech bylo zjištěno, že dochází k nesignifikantnímu snížení ostatních metabolitů Krebsova cyklu (neukázáno).

Zvýšenou aktivitu mTOR jsme zkoumali na buňkách SHSY5Y, které se po přidavku 2HG do média chovali podobně jako fibroblasty – rychleji proliferovaly. Nepodařilo se prokázat žádnou změnu aktivity mTOR na buňkách SHSY5Y po treatmentu 2HG, přestože některé nádorové linie mají dokonce aktivitu mTOR sníženou právě díky nadměrné produkci 2HG. Ta je však podmíněna i nižší aktivitou ATPasy (135).

Zaměřili jsme se tedy na další faktor, který může být ovlivněn skrze 2OG dependentní dioxygenázy, a tím je HIF1 α . Stabilizace HIF, stejně jako ribozomální S6 protein (mTOR), byla měřena na neuroblastomech, protože nebyla k dispozici potkaní protilátka. Ačkoliv nelze tyto výsledky v souvislosti s fibroblasty označit za 100% relevantní, byly pořízeny za stejné koncentrace 2HG, při které ostře proliferovaly fibroblasty, stejně tak jako SHSY5Y při měření replikace jaderné DNA. Daná protilátka proti lidskému HIF1 α však nebyla zcela stabilní, proto byl její účinek potenciován přidavkem CoCl₂, způsobujícím stabilizaci HIF1 α (136). Při přidání 2HG byl HIF1 α za těchto podmínek synergicky stabilizován. Ačkoliv se nejedná o standardní postup, alespoň to vypovídá o cíli, na který je namířeno působení 2HG. Výše uvedená studie na astrocytech však uvádí jako významný cíl *EGLN*, přičemž samotný HIF klesá (96). Na druhou stranu, jiné studie potvrzují, že 2HG stimuluje HIF1 α (36). Faktem však zůstává, že obě stimulační dráhy probíhají skrze hypoxii regulované signální dráhy.

Z výsledků naměřených pomocí BrDU byl zajímavý právě onen vliv přídavku 2HG na růst SHSY5Y i fibroblastů. V dalších experimentech byl proto 2HG přidáván v 2 mM koncentraci k neuroblastomovým buňkám pěstovaným v kompletním médiu. Předpokládali jsme totiž, že jednou z možných příčin rychlejší proliferace může být zvýšená buněčná respirace a syntéza ATP, způsobená přetlakem vyvolaným vysokými hladinami 2HG, potažmo 2OG – navzdory faktu, že 2HG může ATPasu inhibovat (135). Vycházeli jsme z faktu metabolického remodelingu, který by měl veškeré anabolické i katabolické dráhy směřovat k co nejefektivnějšímu dělení (137).

Z výsledků je patrné, že přídavek 2HG do média vyvolá zvýšení intracelulárního 2HG a pokles všech ostatních metabolitů, zejména pak laktátu, který může být jak ukazatelem míry glykolýzy, tak i zapojení buněčné respiraci do produkce energie, respektive aktivity PDH a LDH. Zdá se tedy možné, že 2HG prohloubí buněčnou respiraci, která se projeví větším odběrem/točením substrátů bez jejich kumulace, tím pádem jejich snížením. Zajímavé bylo, že k tomuto jevu došlo relativně rychle (už po 8 hodinách).

Ještě zajímavější se pro nás tedy stala možnost zjistit, jak se budou ty samé buňky chovat v médiu s nižší glukózou bez glutaminu, kde by měla být buněčná respirace snižena (137). Ukázalo se, že po 8 hodinách inkubace s 2HG došlo ke kumulaci jednotlivých metabolitů Krebsova cyklu, s výjimkou 2OG a citrátu, které zůstali prakticky beze změn. U 2OG je obecně známo, že jeho intracelulární koncentrace je jedna z nejnižších v Krebsově cyklu, dá se tedy předpokládat, že jeho neměnná hladina je fyziologickým fenoménem. Naproti tomu stabilní koncentrace citrátu může být ovlivněna jeho exportem do cytosolu a následnou syntézou mastných kyselin.

Naproti tomu, po 50 hodinách došlo k poklesu všech metabolitů, vyjma citrátu a malátu, kde nebyl pokles statisticky významný. Přesto lze říct, že zde může docházet k aktivaci respirace, která se odrazí i na hladinách laktátu, který v tomto případě významně klesl.

S aktivitou respiračního řetězce je spojena i produkce ROS. Zjistili jsme, že po 50 hodinové inkubaci skutečně došlo k zvýšení produkce mitochondriálního superoxidu.

Mnohem zajímavější však je signifikantní zvýšení produkce superoxidu po 8 hodinové inkubaci, kde ještě není plně zapojena buněčná respirace. Příčinou tak dramatického navýšení může být vyšší aktivita 2OG dehydrogenázy, která může produkovat ROS (139). Nasvědčovalo by tomu neměnné množství 2OG a vysoká koncentrace ostatních metabolitů. Na základě těchto dat je třeba zahrnout do možných modulátorů proliferace fibroblastů právě i produkci ROS, které mohou fungovat jako signální molekuly ovlivňující dělení (140).

Dále byly změřeny hladiny 2HG a poměr 2HG/2OG v celé paletě nádorových a zdravých buněk. Byl potvrzen očekávaný fakt, že nádorové buňky produkují více 2HG než jejich netransformované protějšky. Byly porovnávány buňky HTB-125 vs. HTB-126, dále potkaní hepatocyty, které byly po izolaci 24 hodin kultivovány, vs. buňky lidského hepatoblastomu HepG2, a fibroblasty v pokročilé pasáži a v nízké pasáži. Poslední dvě jmenované sice nevykazovaly rysy nádorových buněk, nicméně ve starých fibroblastech mohlo dojít k hromadění mutací vlivem opakovaného pasážování. Ve všech případech se potvrdilo, že 2HG hladina je vyšší u buněk nádorových a fibroblastů ve vysoké pasáži. V celkovém obraze však tyto hladiny nebyly nijak dramaticky odchýlené od koncentrací sledovaných v jiných nádorových buňkách, proto byly tyto výsledky porovnány i s poměry 2HG/2OG v těch samých buňkách. Ukázalo se, že zdravé buňky společně s INS1E mají signifikantně nižší poměr oproti nádorovým buňkám. Na tomto modelu lze tedy jasně odlišit zdravé a nádorové linie, což by při důkladnějším zkoumání mohlo mít významný potenciál při identifikaci tumorů.

V další fázi byly zkoumány hladiny 2HG v kontextu celého živého organismu reprezentovaného potkaním modelem. Byl zkoumán poměr 2HG/2OG v srdci, slezině, játrech, mozku a ušním boltci. Bylo předpokládáno, že poměr 2HG/2OG bude nejvyšší ve slezině, která se podílí na proliferaci β -lymfocytů, střední hodnota že bude v játrech a nízká v mozku a srdci, kde je dělení buněk minimální. Tento předpoklad se však nepotvrdil, naopak došlo k paradoxním výkyvům, například v tkáni mozku. Navíc bylo zajímavé, že hladina 2HG/2OG byla několikanásobně vyšší než po *in vitro* kultivaci, a to i po porovnání hladin ve fibroblastech a v homogenátu ucha. Všechny tyto jevy mohou být důsledkem morfologického uspořádání orgánu, kompartmentalizace, hematoencefalické bariéry, fyziologických či metabolických pochodů a především nesrovnatelnými *in vitro* vs. *in vivo* podmínkami.

Poslední aspekt byl detailně zkoumán na příkladu izolovaných hepatocytů, jejichž poměr 2HG/2OG vykazoval vysoké hodnoty, podobné právě hodnotám zjištěným v izolovaných orgánech. Tato hodnota byla mnohonásobně odlišná od hepatocytů kultivovaných 24 hodin na miskách v růstovém médiu nebo na HepG2 linii, rovněž studované v *in vitro* podmínkách. Při vzájemném porovnání sice bylo potvrzeno, že v nádorových buňkách je nejvyšší hladina samotného 2HG i mezi vzorky *in vivo* a *in vitro*, ovšem hodnotu poměru 2HG/2OG převyšuje jen za předpokladu, že ke srovnání dochází ve stejných růstových podmínkách. Poměr 2HG/2OG v *in vivo* podmínkách převyšuje *in vitro* experimenty na HepG2 a hepatocytech. Tento jev je sice paradoxní, nicméně vysvětluje vysoké hladiny poměrů v jednotlivých orgánech a jeho příčina je s největší pravděpodobností jasně definována samotnou charakteristikou rozdílu *in vivo* a *in vitro*.

Získané výsledky ze zdravých i nádorových buněk a výzkum jejich fenotypových projevů spojených právě s 2HG, včetně možnosti 2HG využít jako marker nádorových nemocí (141, 140), jsme zužitkovali při designování klinické studie ve spolupráci s Onkologickou klinikou VFN. Sérum a moč pacientek s různě rozvinutým nádorem prsu byly podrobeny analýze s cílem určit hladinu 2HG v těchto fluidních vzorcích.

Získání krve, respektive séra, a moče je relativně snadné a obvykle bývá součástí vlastního lékařského, rutinního vyšetření, proto jsou tyto tekutiny u pacientů s tumorem vhodným předmětem výzkumu. Časný marker s možností rychlého a přesného stanovení je obrovskou diagnostickou výhodou.

Z výsledků koncentrací 2HG v moči pacientek s karcinomem prsu je patrné, že hladina 2HG v moči roste s počtem metastáz a se stádiem nemoci. Tento výsledek je v souladu s fenogenetickou studií, která odhaluje, že v prsních karcinomech je výrazně vyšší produkce tohoto metabolitu (142). Studie byla provedena na pacientech i v *in-vitro* podmínkách a 2HG považuje za významný metabolit pro patogenezi prsních tumorů a zároveň ukazuje, že 2HG způsobuje vyšší proliferaci buněk a sníženou míru apoptózy. Jeho produkce je úzce spjata s aktivací či deregulací MYC.

Ve vzorcích séra nedošlo k žádným dramatickým změnám, podle kterých by bylo možné odlišit jednotlivé skupiny. Podobné výsledky byly potvrzeny i u pacientů s gliomem. Hladiny 2HG zde nekorelovaly s velikostí gliomu, dokonce ani v tumorech s mutací IDH1/2 (143). Naznačuje to možnost, že si organizmus i přes existenci solidního tumoru udržuje mimo vlastní ložisko nádoru endogenní rovnováhu a nadbytečný 2HG vyloučí díky filtraci ledvin vylučovací soustavou.

Samostatnou výjimkou je skupina pacientek v remisi, kde je hladina 2HG v moči vyšší než u pacientek ve stádiu 3, byť by hladiny v období remise dle našich odhadů měly být podobné spíše výsledkům zdravých kontrol. Zde však narážíme na komplexní problém, neboť pacientky často absolvují řadu invazivních zákroků, chemo či radioterpii a míra regenerace může být pomalá a doprovázená zánětem. Zánět, jak naznačují i naše výsledky, může rovněž zvyšovat hladiny 2HG.

V kontextu těchto tvrzení je pak velice těžké určit, zdali se samotná hladina 2HG v pokročilých stádiích nemoci a při proliferujících metastázách dá považovat za věrohodnou a zdůvodnitelnou ryze exportem z nádoru, anebo komplexním zasažením organismu, spojeným s dalšími druhotnými faktory léčby.

Toto a další otázky bude muset zodpovědět detailnější výzkum, který probíhá na našich pracovištích v současné době.

6 Závěr

Podařilo se nám prokázat existenci RK a syntézy 2HG v nádorových buňkách prsního karcinomu HTB-126 a MDA-MB-231, dále v nádorových buňkách HepG2, HCT 116, SHSY5Y, PaTu 8902, také v buňkách INS1E a ve zdravých potkaních hepatocytech a fibroblastech. Zároveň byla na liniích HTB-126 a MDA-MB-231 prokázána významná role IDH2 v reverzní syntéze citrátu (RK) a 2HG. Na HTB-126 byl prokázán význam IDH1 jako enzymu, který se také podílí na syntéze 2HG. Ve všech buněčných liniích figuroval glutamin jako zdroj a prekurzor metabolitů RK a 2HG. Dále bylo potvrzeno na buněčné linii HTB-126, že už 5% koncentrace O_2 významně zvyšuje RK, ale už není dostatečná k zvýšení syntézy 2HG – to bylo naměřeno i na SHSY5Y. Nicméně po významné inhibici respiračního řetězce chemickými inhibitory došlo k zvýšené syntéze 2HG i metabolitů RK v HTB-126 i SHSY5Y. Na míru RK má také vliv koncentrace CO_2 , respektive jeho parciální tlak v inkubační atmosféře. V testovaných vzorcích došlo ke korelaci mezi poklesem CO_2 a mírou RK. Syntéza 2HG zůstala stejná, neboť zde oxid uhličitý neslouží jako substrát pro reakci. Hypokapnie je spojována s nedostatečnou respirací, která je v rostoucích nádorech významná. V těchto podmínkách významně vzroste míra RK. Nyní víme, že hladiny CO_2 , úroveň hypoxie a míra RK vzájemně souvisí a jejich rovnováha může být zásadním aspektem pro pochopení životaschopnosti solidního tumoru.

Dále bylo zjištěno, že právě 2HG hraje roli v proliferaci zdravých potkaních fibroblastů. V podmínkách, které stimulují jejich růst, byl 2HG zvýšený, a dokonce po přidání tohoto metabolitu do média došlo k vyšší proliferaci fibroblastů i SHSY5Y, kterou si vysvětlujeme zvýšenou respirací a syntézou ATP. Společně s 2HG byl sledován i poměr 2HG/2OG, který by měl účelněji plnit, díky antagonismu 2HG vůči 2OG dependentním dioxigenázám, roli markeru či referenční hodnoty, a to jak ve zdravých, tak v nádorových buňkách. Ve většině případů koncentrace 2HG korelovala s hodnotou poměru 2HG/2OG v podmínkách stimulujících růst, jedinou výjimkou byly právě SHSY5Y, které pro svůj nádorový charakter nejspíš nereagovali tak senzitivně. Vystavením fibroblastů hypoxii a stimulaci sérem došlo k zvýšení proliferace buněk, spojené s vyšší hladinou 2HG a poměru 2HG/2OG. Přidáním 2HG došlo také k zvýšení proliferace fibroblastů a současně k zvýšení poměru 2HG/2OG, ovšem ve fyziologických hladinách. Podle provedených experimentů pomocí metody Western blot se jako nejslibnější cíl ovlivňující proliferaci jeví právě HIF1 α . Poměry 2HG/2OG byly studovány i v orgánech izolovaných z potkanů. Zde jsme se však nedobrali žádného výrazného trendu, nicméně se ukázalo, že v živém systému je rovnováha mezi 2HG a 2OG posunuta ve prospěch 2HG, což se ustálí po 24 hodinách v *in vitro* podmínkách (izolace hepatocytů – přímá vs. 24 hodinová inkubace).

Naměřená data a obě publikace vytváří konzistentní představu o významu RK a syntézy 2HG, přičemž jasně definují molekulárně mechanistický i fyziologický význam obou drah ve zdravých i nádorových buňkách. Publikace se vzájemně doplňují a vytváří jasnější pohled na metabolismus savčích buněk, přičemž zohledňují řadu onkologických aspektů. Proto zde byla prezentována dosud nepublikovaná data z klinického výzkumu fluidních vzorků pacientek s karcinomem prsu.

Účelem celé studie, která stále trvá, je prokázat či vyvrátit význam 2HG jako markeru solidního tumoru prsu. Jak se z předběžných výsledků ukazuje – 2HG má potenciál pro včasnou diagnostiku karcinomu prsu a po provedení detailní klinické studie by mohl figurovat jako významný ukazatel míry rozvinutí nemoci.

7 Reference

1. Mitochondria and Cancer (2009) (Springer New York, New York, NY) doi:10.1007/978-0-387-84835-8.
2. Vatrinet R, et al. (2015) MITOCHONDRIA:Targeting respiratory Complex I to prevent the Warburg effect. *Int J Biochem Cell Biol*. doi:10.1016/j.biocel.2015.01.017.
3. Crabtree HG (1928) The carbohydrate metabolism of certain pathological overgrowths. *Biochem J* 22(5):1289–98.
4. WARBURG O (1956) On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124(3215):269–70.
5. BLOCH-FRANKENTHAL L, RAM D (1959) The relationship between the Crabtree effect and the oxidative metabolism of glucose and carbohydrate intermediates in ascites tumor cells. *Cancer Res* 19:835–42.
6. IBSEN KH, COE EL, McKEE RW (1959) Energy compensation in the Crabtree effect with Ehrlich ascites carcinoma cells. *Nature* 183(4673):1471.
7. Jose C, Bellance N, Rossignol R (2011) Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: a tumor's dilemma? *Biochim Biophys Acta* 1807(6):552–61.
8. Tavares LC, Jarak I, Nogueira FN, Oliveira PJ, Carvalho R a (2015) Metabolic evaluations of cancer metabolism by NMR-based stable isotope tracer methodologies. *Eur J Clin Invest* 45 Suppl 1:37–43.
9. Courtney R, et al. (2015) Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. *Mol Biol Rep*. doi:10.1007/s11033-015-3858-x.
10. Kim A (2014) Mitochondrial DNA somatic mutation in cancer. *Toxicol Res* 30(4):235–42.
11. Warburg OH (2010) The classic: The chemical constitution of respiration ferment. *Clin Orthop Relat Res* 468(11):2833–9.
12. Vega-Naredo I, et al. (2014) Mitochondrial metabolism directs stemness and differentiation in P19 embryonal carcinoma stem cells. *Cell Death Differ* 21(10):1560–74.
13. Oliveira PF, et al. (2012) Effect of insulin deprivation on metabolism and metabolism-associated gene transcript levels of in vitro cultured human Sertoli cells. *Biochim Biophys Acta* 1820(2):84–9.
14. Granchi C, Fancelli D, Minutolo F (2014) An update on therapeutic opportunities offered by cancer glycolytic metabolism. *Bioorg Med Chem Lett* 24(21):4915–4925.
15. Hamanaka RB, Chandel NS (2012) Targeting glucose metabolism for cancer therapy. *J Exp Med* 209(2):211–5.
16. Vander Heiden MG, et al. (2010) Evidence for an alternative glycolytic pathway in rapidly proliferating cells. *Science* 329(5998):1492–9.
17. Lee J-W, Bae S-H, Jeong J-W, Kim S-H, Kim K-W (2004) Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 36(1):1–12.
18. Isaacs JS, et al. (2005) HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability. *Cancer Cell* 8(2):143–53.
19. Selak MA, et al. (2005) Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* 7(1):77–85.
20. Stalneck CA, et al. (2014) Mechanism by which a recently discovered allosteric inhibitor blocks glutamine metabolism in transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. doi:10.1073/pnas.1414056112.
21. Durán R V, et al. (2012) Glutaminolysis activates Rag-mTORC1 signaling. *Mol Cell* 47(3):349–58.
22. Luo W, et al. (2011) Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 145(5):732–44.
23. Obre E, Rossignol R (2014) Emerging concepts in bioenergetics and cancer research: Metabolic flexibility, coupling, symbiosis, switch, oxidative tumors, metabolic remodeling, signaling and bioenergetic therapy. *Int J Biochem Cell Biol*. doi:10.1016/j.biocel.2014.12.008.
24. Wise DR, et al. (2008) Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(48):18782–7.
25. Kovacevic Z, McGivan JD (1983) Mitochondrial metabolism of glutamine and glutamate and its physiological significance. *Physiol Rev* 63(2):547–605.
26. Reitzer LJ, Wice BM, Kennell D (1979) Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem* 254(8):2669–76.
27. Wice BM, Reitzer LJ, Kennell D (1981) The continuous growth of vertebrate cells in the absence of sugar. *J Biol Chem* 256(15):7812–9.
28. Smolková K, Ježek P (2012) The Role of Mitochondrial NADPH-Dependent Isocitrate Dehydrogenase in Cancer Cells. *Int J Cell Biol* 2012:273947.
29. Smolková K, Dvořák A, Zelenka J, Vítek L, Ježek P (2015) Reductive carboxylation and 2-hydroxyglutarate formation by wild-type IDH2 in breast carcinoma cells. *Int J Biochem Cell Biol*. doi:10.1016/j.biocel.2015.05.012.

30. Ku C, et al. (2015) Endosymbiotic gene transfer from prokaryotic pangenomes: Inherited chimerism in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(33):10139–46.
31. Berry MN (1965) The Effects of Adenine Nucleotides on Pyruvate Metabolism in Rat Liver. *Biochem J*. Jun; 95(3): 587–596.
32. Cardaci S, Ciriolo MR (2012) TCA Cycle Defects and Cancer: When Metabolism Tunes Redox State. *Int J Cell Biol* 2012:161837.
33. Kaufmann Y, Spring P, Klimberg VS (2008) Oral glutamine prevents DMBA-induced mammary carcinogenesis via upregulation of glutathione production. *Nutrition* 24(5):462–9.
34. Lim V, Korourian S, Todorova VK, Kaufmann Y, Klimberg VS (2009) Glutamine prevents DMBA-induced squamous cell cancer. *Oral Oncol* 45(2):148–55.
35. Kaplan RS, Parlo RA, Coleman PS (1986) Measurement of citrate transport in tumor mitochondria. *Methods Enzymol* 125:671–91.
36. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE (1993) p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74(6):957–67.
37. Reid MA, et al. (2013) The B55 α subunit of PP2A drives a p53-dependent metabolic adaptation to glutamine deprivation. *Mol Cell* 50(2):200–11.
38. Dang C V, Le A, Gao P (2009) MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. *Clin Cancer Res* 15(21):6479–83.
39. Eilers M, Eisenman RN (2008) Myc's broad reach. *Genes Dev* 22(20):2755–66.
40. Costello LC, Franklin RB, Feng P, Tan M (2004) Re: Zinc supplement use and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 96(3):239–40; author reply 240–1.
41. Vivanco I (2014) Targeting molecular addictions in cancer. *Br J Cancer* 111(11):2033–8.
42. Wise DR, et al. (2008) Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(48):18782–7.
43. Newsholme P (2001) Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? *J Nutr* 131(9 Suppl):2515S–22S; discussion 2523S–4S.
44. Wiens K, Erdman KA, Stadnyk M, Parnell JA (2014) Dietary Supplement Usage, Motivation, and Education in Young, Canadian Athletes. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. doi:10.1123/ijsnem.2013-0087.
47. Dvořák A, Zelenka J, Smolková K, Vítek L, Ježek P (2016) Background levels of neomorphic 2-hydroxyglutarate facilitate proliferation of primary fibroblasts. *Physiol Res*. Dec 16.
48. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124(3):471–84.
49. Laplante M, Sabatini DM (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149(2):274–93.
50. Lee Y-H, et al. (2015) Gain of HIF-1 α under normoxia in cancer mediates immune adaption through the AKT/ERK and VEGFA axes. *Clin Cancer Res*. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1979.
51. Pérez-Gómez C, et al. (2005) Co-expression of glutaminase K and L isoenzymes in human tumour cells. *Biochem J* 386(Pt 3):535–42.
52. Lee Y-Z, et al. (2014) Discovery of selective inhibitors of Glutaminase-2, which inhibit mTORC1, activate autophagy and inhibit proliferation in cancer cells. *Oncotarget* 5(15):6087–101.
53. Heidelberger C (1975) Chemical carcinogenesis. *Annu Rev Biochem* 44:79–121.
54. Zhuo B, et al. (2015) PI3K/Akt signaling mediated Hexokinase-2 expression inhibits cell apoptosis and promotes tumor growth in pediatric osteosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun* 464(2):401–6.
55. Kvamme E, Nissen-Meyer LSH, Roberg BA, Torgner IA (2008) Novel form of phosphate activated glutaminase in cultured astrocytes and human neuroblastoma cells, PAG in brain pathology and localization in the mitochondria. *Neurochem Res* 33(7):1341–5.
56. Walz S, et al. (2014) Activation and repression by oncogenic MYC shape tumour-specific gene expression profiles. *Nature* 511(7510):483–7.
58. Le A, et al. (2012) Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B cells. *Cell Metab* 15(1):110–21.
59. Xu X, et al. (2015) Tumor suppressor NDRG2 inhibits glycolysis and glutaminolysis in colorectal cancer cells by repressing c-Myc expression. *Oncotarget* 6(28):26161–76.
60. Xiao D, et al. (2015) Myc promotes glutaminolysis in human neuroblastoma through direct activation of glutaminase 2. *Oncotarget* 6(38):40655–66.
61. Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B (2010) The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(5):329–41.

62. Terunuma A, et al. (2014) MYC-driven accumulation of 2-hydroxyglutarate is associated with breast cancer prognosis. *J Clin Invest* 124(1):398–412.
63. Mathias RA, et al. (2014) Sirtuin 4 is a lipamidase regulating pyruvate dehydrogenase complex activity. *Cell* 159(7):1615–25.
64. Beauharnois JM, Bolívar BE, Welch JT (2013) Sirtuin 6: a review of biological effects and potential therapeutic properties. *Mol Biosyst* 9(7):1789–806.
65. Herskovits AZ, Guarente L (2013) Sirtuin deacetylases in neurodegenerative diseases of aging. *Cell Res* 23(6):746–58.
66. Sebastian C, Mostoslavsky R (2010) SIRT3 in calorie restriction: can you hear me now? *Cell* 143(5):667–8.
67. Durán R V, Hall MN (2012) Glutaminolysis feeds mTORC1. *Cell Cycle*. Nov 15;11(22):4107-8. 4107–4108. doi: 10.4161/cc.22632.
68. Weller M, Wick W, von Deimling A (2011) Isocitrate dehydrogenase mutations: a challenge to traditional views on the genesis and malignant progression of gliomas. *Glia* 59(8):1200–4.
69. Losman J-A, et al. (2013) (R)-2-hydroxyglutarate is sufficient to promote leukemogenesis and its effects are reversible. *Science* 339(6127):1621–5.
70. Xu W, et al. (2011) Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* 19(1):17–30.
71. Chalmers RA, et al. (1980) D-2-hydroxyglutaric aciduria: case report and biochemical studies. *J Inherit Metab Dis* 3(1):11–5.
72. Tafti M, et al. (2003) Deficiency in short-chain fatty acid beta-oxidation affects theta oscillations during sleep. *Nat Genet* 34(3):320–5.
151. Struys EA, et al. (2006) Metabolism of gamma-hydroxybutyrate to d-2-hydroxyglutarate in mammals: further evidence for d-2-hydroxyglutarate transhydrogenase. *Metabolism* 55(3):353–8.
73. Struys EA, Verhoeven NM, Brunengraber H, Jakobs C (2004) Investigations by mass isotopomer analysis of the formation of D-2-hydroxyglutarate by cultured lymphoblasts from two patients with D-2-hydroxyglutaric aciduria. *FEBS Lett* 557(1-3):115–20.
74. Ravandi F, et al. (2012) Prognostic significance of alterations in IDH enzyme isoforms in patients with AML treated with high-dose cytarabine and idarubicin. *Cancer* 118(10):2665–73.
75. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML (2002) Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 295(5556):858–61.
76. Wang GL, Semenza GL (1993) Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood* 82(12):3610–5.
77. Gross S, et al. (2010) Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *J Exp Med* 207(2):339–44.
78. Ward PS, et al. (2010) The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell* 17(3):225–34.
79. Mullen AR, et al. (2014) Oxidation of Alpha-Ketoglutarate Is Required for Reductive Carboxylation in Cancer Cells with Mitochondrial Defects. *Cell Rep*. doi:10.1016/j.celrep.2014.04.037.
80. Zhang C, Moore LM, Li X, Yung WKA, Zhang W (2013) IDH1/2 mutations target a key hallmark of cancer by deregulating cellular metabolism in glioma. *Neuro Oncol* 15(9):1114–26.
81. Rakheja D, et al. (2011) Papillary thyroid carcinoma shows elevated levels of 2-hydroxyglutarate. *Tumour Biol* 32(2):325–33.
82. Claus EB, et al. (2015) Survival and low-grade glioma: the emergence of genetic information. *Neurosurg Focus* 38(1):E6.
83. Mur P, et al. (2013) Codeletion of 1p and 19q determines distinct gene methylation and expression profiles in IDH-mutated oligodendroglial tumors. *Acta Neuropathol* 126(2):277–89.
84. Yao K, Duan Z, Hu Z, Bian Y, Qi X (2014) [Correlation of chromosome 1p and 19q status and expression of R132H mutant IDH1 protein in oligodendroglial tumors]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 43(10):663–7.
85. Sun RC, Denko NC (2014) Hypoxic regulation of glutamine metabolism through HIF1 and SIAH2 supports lipid synthesis that is necessary for tumor growth. *Cell Metab* 19(2):285–92.
86. Kalinina J, et al. (2012) Detection of “oncometabolite” 2-hydroxyglutarate by magnetic resonance analysis as a biomarker of IDH1/2 mutations in glioma. *J Mol Med (Berl)* 90(10):1161–71.
87. Borger DR, et al. (2014) Circulating oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a potential surrogate biomarker in patients with isocitrate dehydrogenase-mutant intrahepatic cholangiocarcinoma. *Clin Cancer Res* 20(7):1884–90.

88. Janin M, et al. (2014) Serum 2-hydroxyglutarate production in IDH1- and IDH2-mutated de novo acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association group. *J Clin Oncol* 32(4):297–305.
89. Leonardi R, Subramanian C, Jackowski S, Rock CO (2012) Cancer-associated isocitrate dehydrogenase mutations inactivate NADPH-dependent reductive carboxylation. *J Biol Chem* 287(18):14615–20.
90. Kappler M, et al. (2016) Normoxic accumulation of HIF1 α is associated with glutaminolysis. *Clin Oral Investig*. doi:10.1007/s00784-016-1780-9.
91. Durán R V, et al. (2013) HIF-independent role of prolyl hydroxylases in the cellular response to amino acids. *Oncogene* 32(38):4549–56.
92. Kaelin WG (2011) Cancer and altered metabolism: potential importance of hypoxia-inducible factor and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 76:335–45.
93. Koivunen P, et al. (2012) Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation. *Nature* 483(7390):484–8.
94. Yen KE, Bittinger M a, Su SM, Fantin VR (2010) Cancer-associated IDH mutations: biomarker and therapeutic opportunities. *Oncogene* 29(49):6409–17.
95. Krell D, et al. (2011) Screen for IDH1, IDH2, IDH3, D2HGDH and L2HGDH mutations in glioblastoma. *PLoS One* 6(5):e19868.
96. Lin J, et al. (2012) IDH1 and IDH2 mutation analysis in Chinese patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Ann Hematol* 91(4):519–25.
97. Hartong DT, et al. (2008) Novel insights into the contributions of isocitrate dehydrogenases to the Krebs cycle from patients with retinitis pigmentosa. *Nat Genet*. October ; 40(10): 1230–1234. doi:10.1038/ng.223.
98. Krishan A (1975) Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol* 66(1):188–193.
99. Sasaki DT, Dumas SE, Engleman EG (1987) Discrimination of viable and non-viable cells using propidium iodide in two color immunofluorescence. *Cytometry* 8(4):413–20.
100. Giusti I, et al. (2016) From glioblastoma to endothelial cells through extracellular vesicles: messages for angiogenesis. *Tumour Biol*. doi:10.1007/s13277-016-5165-0.
101. Mullen AR, et al. (2012) Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature* 481(7381):385–8.
102. Gameiro PA, et al. (2013) In vivo HIF-mediated reductive carboxylation is regulated by citrate levels and sensitizes VHL-deficient cells to glutamine deprivation. *Cell Metab* 17(3):372–85.
103. Ravandi F, et al. (2012) Prognostic significance of alterations in IDH enzyme isoforms in patients with AML treated with high-dose cytarabine and idarubicin. *Cancer* 118(10):2665–73.
104. Borger DR, et al. (2014) Circulating oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a potential surrogate biomarker in patients with isocitrate dehydrogenase-mutant intrahepatic cholangiocarcinoma. *Clin Cancer Res* 20(7):1884–90.
105. Chandel NS, Budinger GR, Choe SH, Schumacker PT (1997) Cellular respiration during hypoxia. Role of cytochrome oxidase as the oxygen sensor in hepatocytes. *J Biol Chem* 272(30):18808–16.
106. Scott DA, et al. (2011) Comparative metabolic flux profiling of melanoma cell lines: beyond the Warburg effect. *J Biol Chem* 286(49):42626–34.
107. Zhou W, Liotta L a, Petricoin EF (2013) Cancer metabolism and mass spectrometry-based proteomics. *Cancer Lett*. doi:10.1016/j.canlet.2013.11.003.
108. Wise DR, et al. (2011) Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of α -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(49):19611–6.
109. Reitman ZJ, Parsons DW, Yan H (2010) IDH1 and IDH2: not your typical oncogenes. *Cancer Cell* 17(3):215–6.
110. Nikiforov A, Dölle C, Niere M, Ziegler M (2011) Pathways and subcellular compartmentation of NAD biosynthesis in human cells: from entry of extracellular precursors to mitochondrial NAD generation. *J Biol Chem* 286(24):21767–78.
111. Intlekofer AM, et al. (2015) Hypoxia Induces Production of L-2-Hydroxyglutarate. *Cell Metab* 22(2):304–11.
112. Kim J, Gao P, Dang C V (2007) Effects of hypoxia on tumor metabolism. *Cancer Metastasis Rev* 26(2):291–8.
113. Jiang P, Du W, Mancuso A, Wellen KE, Yang X (2013) Reciprocal regulation of p53 and malic enzymes modulates metabolism and senescence. *Nature* 493(7434):689–93.
114. Chen J-Q, Russo J (2012) Dysregulation of glucose transport, glycolysis, TCA cycle and glutaminolysis by oncogenes and tumor suppressors in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1826(2):370–84.
115. Chaneton B, et al. (2012) Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2. *Nature* 491(7424):458–62.
116. Ye J, et al. (2014) Serine Catabolism Regulates Mitochondrial Redox Control during Hypoxia. *Cancer Discov* 4(12):1406–17.

117. Lewis CA, et al. (2014) Tracing compartmentalized NADPH metabolism in the cytosol and mitochondria of mammalian cells. *Mol Cell* 55(2):253–63.
118. Vousden KH (2000) p53: death star. *Cell* 103(5):691–4.
119. Collier HA (2014) Is cancer a metabolic disease? *Am J Pathol* 184(1):4–17.
120. Andersson a K, et al. (2011) IDH1 and IDH2 mutations in pediatric acute leukemia. *Leukemia* 25(10):1570–7.
121. Grassian AR, et al. (2014) IDH1 mutations alter citric acid cycle metabolism and increase dependence on oxidative mitochondrial metabolism. *Cancer Res* 74(12):3317–31.
122. Ohmiya H, Tanabe M, Sawamura M (2011) Copper-catalyzed carboxylation of alkylboranes with carbon dioxide: formal reductive carboxylation of terminal alkenes. *Org Lett* 13(5):1086–8.
123. Mullen AR, et al. (2014) Oxidation of alpha-ketoglutarate is required for reductive carboxylation in cancer cells with mitochondrial defects. *Cell Rep* 7(5):1679–90.
124. Reitman ZJ, et al. (2011) Profiling the effects of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations on the cellular metabolome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 22;108(8):3270–5. doi: 10.1073/pnas.1019393108.
125. Skelin M, Rupnik M (2010) Pancreatic Beta Cell Lines and their Applications in Diabetes Mellitus Research. (May):105–113.
126. Rydström J Mitochondrial NADPH, transhydrogenase and disease. *Biochim Biophys Acta* 1757(5-6):721–6.
127. Yin F, Sancheti H, Cadenas E (2012) Silencing of nicotinamide nucleotide transhydrogenase impairs cellular redox homeostasis and energy metabolism in PC12 cells. *Biochim Biophys Acta* 1817(3):401–9.
128. Albracht SPJ, Meijer AJ, Rydström J (2011) Mammalian NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) and nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) together regulate the mitochondrial production of H₂O₂--implications for their role in disease, especially cancer. *J Bioenerg Biomembr* 43(5):541–64.
129. Gameiro P a, Laviolette L a, Kelleher JK, Iliopoulos O, Stephanopoulos G (2013) Cofactor balance by nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT) coordinates reductive carboxylation and glucose catabolism in the tricarboxylic acid (TCA) cycle. *J Biol Chem* 288(18):12967–77.
130. Marín-García J (2010) Thyroid hormone and myocardial mitochondrial biogenesis. *Vascul Pharmacol* 52(3-4):120–30.
131. Povey S, et al. (1981) Deficiency of malic enzyme: a possible marker for malignancy in lymphoid cells. *Ann Hum Genet* 45(Pt 3):237–52.
132. Intlekofer AM, et al. (2015) Hypoxia Induces Production of L-2-Hydroxyglutarate. *Cell Metab* 22(2):304–11.
133. Rutherford RB (1976) Platelet factors stimulate fibroblasts and smooth muscle cells quiescent in plasma serum to proliferate. *J Cell Biol* 69(1):196–203.
134. Stanton RC, Seifter JL, Boxer DC, Zimmerman E, Cantley LC (1991) Rapid release of bound glucose-6-phosphate dehydrogenase by growth factors. Correlation with increased enzymatic activity. *J Biol Chem* 266(19):12442–8.
135. Tian WN, Pignatari JN, Stanton RC (1994) Signal transduction proteins that associate with the platelet-derived growth factor (PDGF) receptor mediate the PDGF-induced release of glucose-6-phosphate dehydrogenase from permeabilized cells. *J Biol Chem* 269(20):14798–805.
136. BRODIE AF, LIPMANN F (1955) Identification of a gluconolactonase. *J Biol Chem* 212(2):677–85.
137. Sukhatme VP, Chan B (2012) Glycolytic cancer cells lacking 6-phosphogluconate dehydrogenase metabolize glucose to induce senescence. *FEBS Lett* 586(16):2389–95.
138. Schwartzenberg-Bar-Yoseph F, Armoni M, Karnieli E (2004) The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer Res* 64(7):2627–33.
139. Hitosugi T, et al. (2012) Phosphoglycerate mutase 1 coordinates glycolysis and biosynthesis to promote tumor growth. *Cancer Cell* 22(5):585–600.
140. Kondoh H, et al. (2005) Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. *Cancer Res* 65(1):177–85.
141. Kranendijk M, et al. (2010) IDH2 Mutations in Patients with D-2-hydroxyglutaric aciduria. *Science*. Oct 15; 330(6002):336. doi: 10.1126/science.1192632.
142. Fan J, et al. (2015) Human phosphoglycerate dehydrogenase produces the oncometabolite D-2-hydroxyglutarate. *ACS Chem Biol* 10(2):510–6.
143. Zhao H, Wu Y, Chen Y, Liu H (2015) Clinical significance of hypoxia-inducible factor 1 and VEGF-A in osteosarcoma. *Int J Clin Oncol* 20(6):1233–43.
144. Ma S, et al. (2015) D-2-hydroxyglutarate is essential for maintaining oncogenic property of mutant IDH-containing cancer cells but dispensable for cell growth. *Oncotarget* 6(11):8606–8620.
145. Clark RAF, Ghosh K, Tonnesen MG (2007) Tissue engineering for cutaneous wounds. *J Invest Dermatol* 127(5):1018–29.

146. Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, Poellinger L (1997) Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. Proc Natl Acad Sci U S A 94(11):5667-72.