

A lipid anyagcsere összetett szerepe a tumornövekedés során

37. OTDK
Biológia Szekció

Készítette:

Károlyi Dorottya

Biológus mesterszak, 2. évfolyam

Molekuláris Genetika, Sejt- és Fejlődéstudomány szakirány

Témavezető:

Dr. Takáts Szabolcs, egyetemi adjunktus

ELTE Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2024.

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék.....	3
Összefoglaló.....	4
1. Bevezetés.....	5
1.1 A rák és a lipidszintézis kapcsolata.....	5
1.2 A lipidszintézis folyamata	6
1.3 A rák vizsgálata Drosophilában	7
2. Célkitűzések	9
3. Anyagok és módszerek:.....	10
3.1 Drosophila genetika és genetikailag indukált tumorigenezis.....	10
3.2 Lipidfestés	12
3.3 Genetikai szűrés.....	12
3.4 Immuncitokémia.....	13
3.5 Ex vivo	13
3.6 TMRM festés.....	13
3.7 Western blot.....	14
3.8 Statisztika	15
4. Eredmények és megvitatásuk	17
4.1 A lipid anyagcsere szerepe a tumorban.....	17
4.2 Genetikai szűrés.....	17
4.3 Az ACC tumornövekedésre gyakorolt hatásának lehetséges sejtbioológiai okai	19
4.4 A lipid anyagcsere és a mitokondriális rendszer kapcsolatának vizsgálata	23
Összegzés	25
Köszönetnyilvánítás.....	26
Irodalom	27

Rövidítésjegyzék

Rövidítés	Feloldás angolul	Feloldás magyarul
ACC	Acetyl-CoenzymeA Carboxylase	Acetil-KoenzimA-Karboxiláz
Acetil-CoA	Acetyl-CoenzymeA	Acetil-KoenzimA
ACSL	Acyl-CoenzymeA Synthetase	Acil-Koenzim-A Szintetáz
AGPAT	1-Acylglycerol-3-Phosphate-O-Acyltransferase	1-Acilglicerol-3-Poszfát-O-Aciltranszferáz
CDP	Cytidine Diphosphate	Citidin Difoszfát
CDS	CDP-Diacylglycerol Synthase	CDP-Diacilglicerol Szintáz
CDP-Cho	CDP-choline	CDP-kolin
CDP-Etn	CDP-ethanolamine	CDP-etanolamin
DAG	Diacylglycerol	Diacilglicerol
DGAT	Diacylglycerol-O-Acyltransferase	Diacilglicerol-O-Aciltranszferáz
DGKE	Diacylglycerol Kinase Epsilon	Diacilglicerol Kináz Epsilon
FA	Fatty Acid	zsírsav
FA-CoA	Fatty Acyl-CoenzymeA	zsírsav-Koenzim-A
FASN	Fatty Acid Synthase	zsírsav-szintáz
G-3-P	Glycerol-3-phosphate	Glicerol-3-foszfát
GPAT	Glycerol-3-phosphate Acyltransferase	Glicerol-3-foszfát Aciltranszferáz
LPA	Lysophosphatidic Acid	Lizofoszfatidsav
LPIN	Lipin enzyme	Lipin enzim
MARCM	Mosaic Analysis with Repressible Cell Marker	genetikai mozaik elemzés represszálnakó sejtmárkerrel
OA	Oleic Acid	olajsav
PA	Phosphatidic Acid	foszfátidsav
PC	Phosphatidylcholine	foszfátidilkolin
Pcyt1	Phosphate cytidyltransferase 1	Foszfát-citidil -transzferáz 1
Pcyt2	Phosphate cytidyltransferase 2	Foszfát-citidil -transzferáz 2
PE	Phosphatidylethanolamine	foszfátidiletanolamin
PG	Phosphatidylglycerol	foszfátidilglicerol
P-H3	Phospho-Histone 3	Foszfó-Hisztón 3
PI	Phosphatidylinositol	foszfátidilinozitol
PISD	Phosphatidylserine Decarboxylase	foszfátidilszerin dekarboxiláz
PLIN	Perilipin	Perilipin
PS	Phosphatidylserine	foszfátidilszerin
RNSi	RNA interference	ribonukleinsav (RNS) interferencia
SREBP	Sterol regulatory element binding protein	Szterol Regulált Elem Kötő Fehérje
TMRM	Tetramethylrhodamine-Methyl-Ester	Tetrametilrhodamin-Metil-Észter
TOR	Target Of Rapamycin	Rapamicin célfehérje

Összefoglaló

A lipidszintézis egy erősen szabályozott és összetett folyamat, mely alapvetően fontos a különböző sejtfunkciók normál működéséhez. Ugyanakkor a megfelelő lipid ellátottság számos rosszindulatú daganat progressziójához is nélkülözhetetlen. Ennek ellenére a lipidszintézis egyes lépéseinek szerepe a tumorok növekedésében még mindig kevésbé tisztázott. Kutatásunk során egy *Drosophila* tumormodellt használva egy kisléptékű genetikai szűrést végeztünk el, mely során a lipidszintézis egyes komponenseit a tumorokban RNS-interferenciával csendesítettük és azt találtuk, hogy számos, a neutrális lipidek szintézisében résztvevő enzim hiánya gátolja a tumorok növekedését. A lipidszintézis folyamatának legkorábbi lépésében résztvevő enzim, az acetyl-coenzim-A-karboxiláz (ACC) szerepét vizsgálva azt is megállapítottuk, hogy ezen enzim hiányában a késői stádiumú daganat növekedése nagymértékben gátolt, ugyanakkor a tumor korai fejlődését nem befolyásolta. Ez összefügghet azon megfigyelésünkkel, hogy zsírsav szintézis hiányában a TOR (Target of rapamycin) növekedési jelátviteli útvonala aktivitása csökkent. Végül azt is megfigyeltük, hogy a neutrális lipideket szintetizáló útvonala enzimeit mellett az egyik fő membránlipid, a foszfatidil-etanolamin keletkezésének egy alternatív, mitokondrium-specifikus útvonala is kiemelkedő szerepe van a rosszindulatú tumorok növekedésében. Összességében kutatásunk segít megérteni, hogy a lipidszintézis folyamatának mely lépései meghatározóak a tumor növekedése során.

1. Bevezetés

1.1 A rák és a lipidszintézis kapcsolata

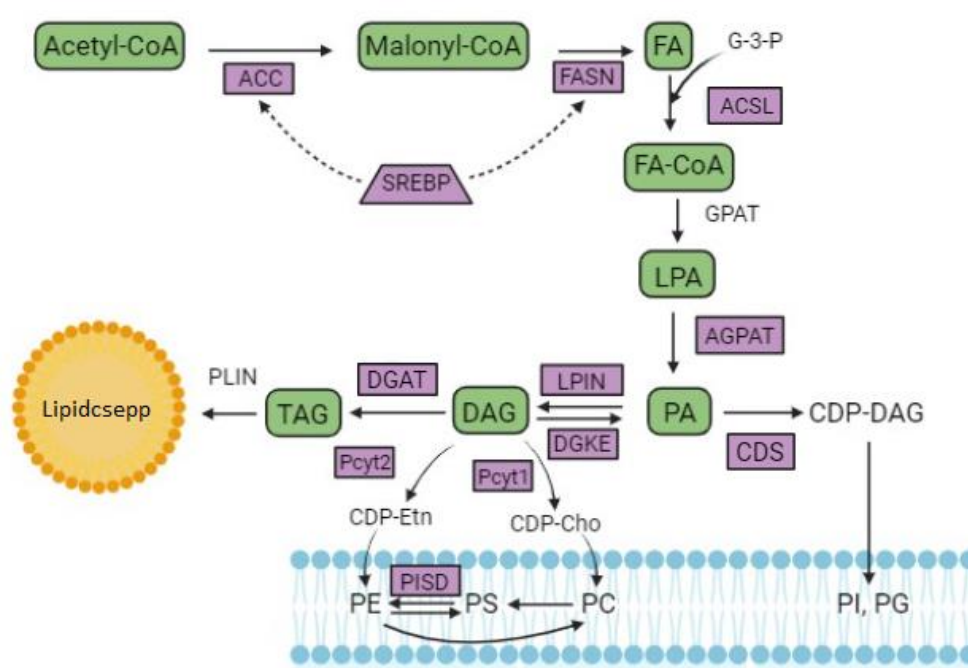
A rosszindulatú daganatos elváltozások mára civilizációs betegségekké váltak, ezzel igen súlyos terhet róva az egészségügyre. Éppen ezért, a tumorok létrejöttének és növekedési mechanizmusának vizsgálata az élettudományok rendkívül fontos kutatási területe.

Számos tanulmány kimutatta, hogy a daganatos megbetegedések nagymértékben függenek a hozzáférhető lipidek mennyiségétől, illetve az ezeket előállító anyagcsere folyamatoktól, mint a zsírsavszintézis vagy a lipolízis^{1,2}, így e folyamatok a tumorbiológia kiemelt kutatási területének számítanak. Az azonban máig nem tisztázott, hogy a zsírsavak szintézise, majd az ezeket felhasználó lipidszintézis útvonalaknak pontosan mely lépései szükségesek a tumorok növekedéséhez. Ezek megismerésével megtalálhatjuk a rákos sejtek anyagcseréjének olyan érzékeny pontjait, melyek a későbbiekben tumor ellenes terápiás módszerek célpontjai lehetnek³. Léteznek is már olyan ígéretes zsírsav-szintáz gátló hatóanyagok, melyek potenciálisan terápiás alkalmazhatóságát jelenleg is tesztelik⁴.

A sejtek lipid anyagcseréjének szabályozásában számos, evolúciósan konzervált jelátviteli útvonal vesz részt. Ezen útvonalak az anyagcsere termékek szintjén keresztül közvetve, illetve akár közvetlen jeltovábbítás útján is befolyásolhatják mind az egészséges, mind pedig a rákos sejtek életképességét és osztódását. Ezek közül kiemelt szereppel bír az Insulin/TOR jelátvitel, mely elsősorban a sejtek növekedéséért és a bennük zajló bioszintetikus folyamatok serkentéséért felelős, aktivitása pedig nagyban függ a rendelkezésre álló tápanyagok (aminosavak, cukrok, lipidek) szintjétől⁵. Ugyanakkor a TOR jelátvitel kóros túlműködését számos ráktípusban is leírták^{6,7}. Az azonban még mindig nem tisztázott, hogy ebben milyen mértékben meghatározó a lipid anyagcserében betöltött szerepe, illetve a hozzáférhető lipidek mennyisége. A lipid anyagcsere folyamatának és a különböző jelátviteli útvonalakkal való kölcsönhatásának megismerése tehát a tumorbiológia egy potenciálisan nagy jelentőséggel bíró területe. Az így feltárt molekuláris folyamatok feltárásával és ezáltal a jelátviteli és bioszintetikus útvonalak manipulálásával közelebb kerülhetünk nem csak ahhoz, hogy a meglévő a daganatos betegségeket kezeljük, de akár a kialakulásukat is megelőzhetjük.

1.2 A lipidszintézis folyamata

A lipidszintézis egy számos komponenst és enzimatikus reakciók sorozatát magába foglaló folyamat (**1. ábra**). A lipidszintézis alapanyaga, az acetyl-koenzim-A (acetyl-CoA) több lépésen keresztül először zsírsavakká majd neutrális lipidekké – például di- és trigliceriddé (diacylglycerin/DAG és triacylglycerin/TAG) –, vagy membránlipidekké alakul. Az újonnan szintetizált neutrális lipidek többnyire intracelluláris lipidcseppekbe épülnek be, valamint a neutrális lipidszintézis köztes termékei, mint a foszfatidsav (PA) és a DAG szintén fontos prekursorokként szolgálnak a különböző glicerofosfolipid típusú membránlipidek szintéziséhez, illetve számos jelátviteli útvonal közvetlen résztvevői is lehetnek.



1. ábra: A lipidszintézis egyes lépéseit és a folyamatban résztvevő enzimeket összefoglaló ábra. A lilával színezett komponenseket vizsgáltuk a későbbiekben bemutatott genetikai szűrés során. A Rövidítésjegyzékben megtalálható az ábrán szereplő komponensek feloldása.
BioRenderen szerkesztett, saját ábra.

A lipidszintézisben résztvevő gének kifejeződését szabályozó transzkripció faktor a SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein). A sejtek alacsony lipidszintje esetén a SREBP aktiválódik és a sejtmagba transzlokálódva elősegíti a lipidszintézis génjeinek kifejeződését. Az ACC (Acetyl-Coenzyme A-carboxylase) enzim katalizálja az acetyl-KoA átalakulását malenyl-KoA-vá, melyből a FASN (Fatty Acid Synthase) zsírsav-szintáz segítségével

fokozatosan hosszú láncú telített zsírsavak keletkeznek. Az ACSL (Acyl-CoA-Synthetase) enzimek e zsírsavak koenzim-A-hoz való konjugációját (acyl-CoA) katalizálják. Az ilyen módon aktivált zsírsavakat a GPAT (Glycerolphosphate-acyltransferase) egy glicerín-3-foszfát molekulához kapcsolja és így lizofoszfátidsavat hoz létre (LPA). Az AGPAT (1-acilglicerín-3-foszfát-O-aciltranszferáz) a LPA átalakulását katalizálja foszfátidsavvá (PA) egy további zsírsavlánc hozzáadásával. A lipin enzimek (LPIN) a foszfátidsavat alakítják át DAG-é, míg a DGK (Diacylglycerol Kinase) a DAG foszforilálásával visszaalakítja foszfátidsavvá. A DGAT (diacylglicerín-O-aciltranszferáz) enzimek a DAG triacylgliceriddé (TAG) alakulásában vesznek részt, egyben ők a neutrális lipidek szintézisének utolsó komponensei.

A legjelentősebb membránlipidek, a foszfatidiletanolamin (PE) és a foszfatidilkolin (PC) keletkezésének fő útvonalának kezdeti lépésében a Pcyt1 (foszfát-citidil-transzferáz 1) és a Pcyt2 enzimek vesznek részt. A Pcyt1 katalizálja a CDP-kolin szintézisét, a Pcyt2 pedig a CDP-etanolamin szintéziséért felelős. A PE emellett egy alternatív, a mitokondriumok membránjához köthető folyamat során is létrejöhet, amely során a PISD (foszfatidil-szerin-dekarboxiláz) a foszfatidil-szerint (PS) alakítja át PE-ná. A további membránlipidek, a foszfatidilinozitol illetve a foszfatidilglicerín szintéziséhez vezető útvonal első lépésénél pedig a CDS (CDP-Diacylglycerol Synthase) enzim szerepel.

1.3 A rák vizsgálata Drosophilában

A *Drosophila melanogaster* kiváló modellrendszere mind a lipid anyagcsere mind pedig a humán betegségek vizsgálatának. A fajt a rövid, körülbelül 10 napos életsiklus, nagyfokú termékenység, egyszerű kromoszomális felépítés és könnyen biztosítható fenntarthatóság jellemzi. Az emberi szervezet működésével meglepően nagyfokú hasonlóságot mutat, 289 humán betegséghez köthető emberi génből 197-nek van muslicában is ortológja⁸. Az általunk használt *Drosophila* modell egy általánosan elfogadott és egyre népszerűbb eszköz a rosszindulatú tumoros elváltozások és a különböző jelátviteli útvonalak közötti összefüggések feltárására⁹. A humán daganatos megbetegedések közel 90%-a hám eredetű. A rák kialakulása során jellemző a sejtpolaritás elvesztése, mely a sejtek fokozott mobilitásához vezet¹⁰. Az ecetmuslica lárvák fejlődő szeme kiválóan alkalmas az epitheliális tumor modellezésére, valamint a kooperatív tumorképződés vizsgálatára, köszönhetően a MARCM rendszernek, mely lehetővé teszi a tumorszupresszor gének és onkogén mutációk egyidejű indukcióját^{11,12}. Emellett az ecetmuslicában hasonló anyagcsere elváltozások jelennek meg, mint a humán

metabolikus zavaroknál, így az ilyen betegségmodell használata elősegíti a betegségek háttérében álló patomechanizmusok megértését, valamint lehetővé teszik a teljes genomra kiterjedő megközelítéseket is, mivel a zsír és membránlipid anyagcsere és a zsírraktározási zavarokban szerepet játszó génjeiket napjainkra már szinte teljesen feltérképezték¹³.

2. Célkitűzések

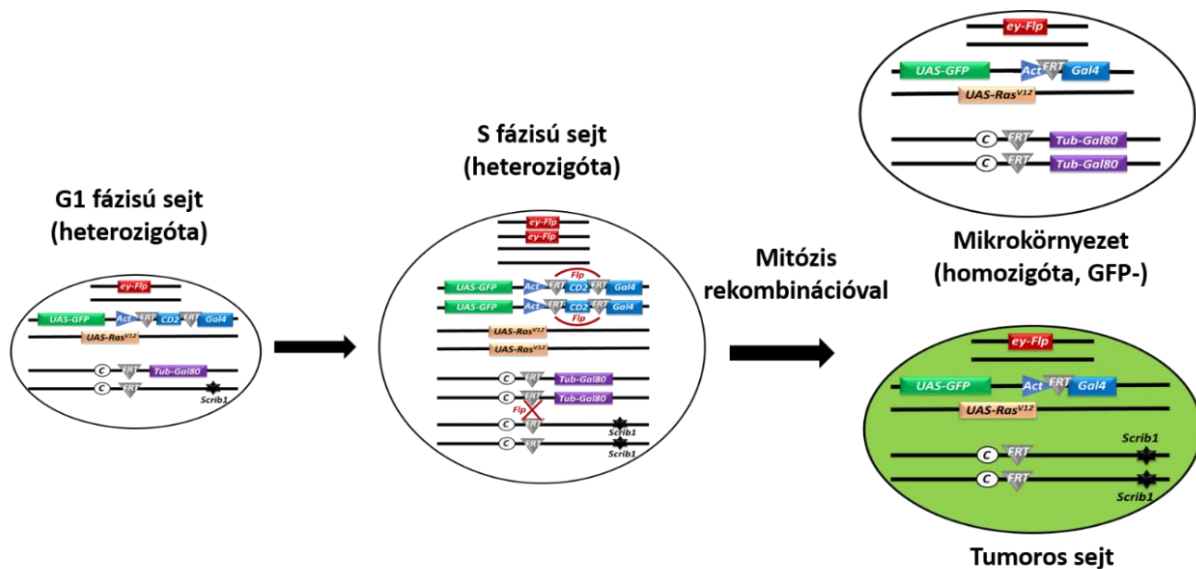
Kutatásunk legfőbb célja az volt, hogy mélyebb betekintést nyerjünk a lipidszintézis és a rosszindulatú tumorfejlődés közötti összefüggésekbe. Vizsgálódásunk fő célkitűzései így az alábbiak voltak:

1. Genetikai szűrés keretén belül megvizsgálni a lipidszintézis különböző lépéseinek hatását a tumorok növekedésére.
2. Megállapítani, hogy lipidszintézis hiánya milyen lehetséges sejtbiológiai jelenségeken és jelátviteli útvonalakon keresztül hat a tumornövekedésre.
3. Megérteni, hogy a lipidanyagcsere tumornövekedést is érintő lépései hatással vannak-e a mitokondriumok működésére.

3. Anyagok és módszerek:

3.1 Drosophila genetika és genetikailag indukált tumorigenezis

A kísérletek során használt ecetmuslicákat üvegcsövekben, agar-kukoricaliszt-élesztő tápon tartottam fenn. Az adott vizsgálatokhoz szükséges keresztezéseket tartalmazó csöveket termosztátban állandó hőmérsékleten (25°C-on) tartottam.



2. ábra: A kutatás során alkalmazott, genetikailag indukált tumormodell létrehozásához használt rendszereket bemutató sematikus ábra. Fontos megjegyezni, hogy az ábrán csak a rekombináns sejteket eredményező eseménysor látható. Az ugyanilyen gyakorisággal bekövetkező, de heterozigóta, nem tumoros sejteket létrehozó eseménysor az ábrán, a jobb átláthatóság miatt, nem szerepel. Takáts Szabolcs ábrája.

A rosszindulatú tumorok létrehozásához MARCM (Mosaic Analysis with Repressible Cell Marker) stratégiát alkalmaztunk (2. ábra)^{14,15}. Ennek során egy *ey-Flp*; *Act-FRT-CD2-FRT-Gal4*, *UAS-GFP*; *FRT82B tub-Gal80* genotípusú (MARCM) törzset használtunk, amelyet az alábbiakban ismertetésre kerülő effektor törzsekkel kereszteztünk. Az így létrejövő lárvák fejlődő szemében a tumorfejlődést szomatikus rekombinációval indukáltuk az FLP/FRT helyspecifikus rekombináza és *Gal4/UAS/Gal80* irányított expressziós rendszer segítségével. A módszer eredményeként *Gal4*-et expresszáló GFP pozitív sejtklónok jönnek létre, amelyek vad típusú szem epitéliummá, illetve jó- vagy rosszindulatú daganattá fejlődnek. A tumor típusa az effektor törzsek genotípusától függ. A vad típusú epitélium létrehozása során egy *FRT82B*-helyet hordozó (*FRT* kontrol/*FRT* ctrl) de egyébként vad típusú állatokat kereszteztünk a MARCM törzsszel. Jóindulatú tumor létrehozásához, *UAS-Ras[V12]*; *FRT82B* genotípusú (*Ras*

kontroll/RC tumor) effektor törzs, rosszindulatú esetén pedig UAS-Ras[V12]; FRT82B Scrib[d1] genotípusú (Ras Scrib/RS tumor) effektor törzs egyedeit kereszteztünk a MARCM-hez. Így a létrejövő rosszindulatú tumorok nem csak a Ras[V12]-t termelik túl, hanem homozigóta mutások lesznek a Scribble sejt polaritás gén funkcióvesztéses alléljére (ez kísérlettől függően a Scrib[d1] vagy Scrib[d2] allél volt). Emellett rekombinációval létrehoztunk egy UAS-Acc RNAi, UAS-Ras[V12]; FRT82B Scrib[d1] és egy UAS-PISD RNAi, Ras[V12]; FRT82B Scrib[d1] törzset is, amit a MARCM rendszerhez keresztezve lipidszintézis hiányos tumorokat (RS ACC és RS PISD tumor) hozhattunk létre. A kutatás során az alábbi szelekciót segítő domináns markereket és balancer kromoszómákat használtunk: Sp; Cyo; Cyo, dfdYFP; TM6c. A felhasznált törzsek genotípusát az **1.táblázat** tartalmazza.

Alaptörzsek	
Genotípus	Szövegben használt rövidítés
ey-FLP; Act-FRT-CD2-FRT-Gal4, UAS-GFP; FRT82B tub-Gal80	MARCM törzs
+/+; +/+; FRT82B kontroll	FRT kontroll effektor törzs
+/+; UAS-Ras[V12]; FRT82B kontroll	RC effektor törzs
+/+; UAS-Ras[V12]; FRT82B Scrib[d1]	RS effektor törzs
+/+; UAS-Ras[V12], Acc RNAi[KK102082]; FRT82B Scrib[d1]	RS ACC effektor törzs
+/+; UAS-Ras[V12], PISD RNAi; FRT82B Scrib[d1]	RS PISD effektor törzs
+/+; Sp/Cyo, dfdYFP; UAS-Ras[V12], FRT82B Scrib[d2]	törzs a genetikai szűréshez
RNS interferencia törzsek	
Genotípus	Törzsszám/származási hely
+/+; UAS-Acc RNAi[KK102082]; +/+	108631 / VDRC
+/+; UAS-Agpat3 RNAi; +/+	4729R-1 / NIG-Fly
+/+; UAS-DGKepsilon RNAi; +/+	8657R-1 / NIG-Fly
+/+; UAS-Pcyt1 RNAi; +/+	1049R-1 / NIG-Fly
+/+; UAS-Pcyt2 RNAi; +/+	18330R-2 / NIG-Fly
+/+; UAS-PISD RNAi; +/+	5991R-2 / NIG-Fly
+/+; UAS-SREBP[dN]; +/+	8239 / BDSC
y1 v1; UAS-Lpin RNAi[HMJ30181]/Cyo; +/+	63614 / BDSC
y1 v1; UAS-Acsl RNAi[HMS02307]; +/+	41885 / BDSC
y1 v1; UAS-mdy RNAi[HMC06242]/Cyo; +/+	65963 / BDSC
y1 v1; UAS-CDS RNAi[HMJ22055]; +/+	58118 / BDSC

1.táblázat: A kísérletek során felhasznált Drosophila genotípusok.

3.2 Lipidfestés

A tumoros sejtek megváltozott lipid anyagcseréjének vizualizálásához LipidTox (#H34477, Thermo) festést végeztem, kontrol imágó korongokon és jó, valamint rosszindulatú tumorokon, amelyeket a MARCM törzs és a FRT82B, az UAS-Ras[V12]; FRT82B és UAS-Ras[V12]; FRT82B Scrib[d1] effektor törzsek összekeresztezésével hoztam létre. Mindhárom genotíusból 7-8 darab 6 napos lárva szem diszkuszát boncoltam ki PBS oldatban, majd 4%-os formalin-PBS-ben fixáltam 30 percig. A fixálószer eltávolításához a mintákat 2x öblítettem, majd 1x15 percig mostam PBS pufferben. Az imágó korongok megfestéséhez a mintákat genotípusonként 100-100 µl 1:500 arányban LipidTox-ot tartalmazó PBS oldatban inkubáltam 4°C-on egy éjszakán át. Másnap a festékoldat eltávolításához ismét 2x öblítettem majd 1x15 percig mostam a mintákat PBS-ben. Végül tiszta glicerinen fedtem le a diszkuszokat, és ApoTome2 konfokális feltétellel ellátott Zeiss AxioImager.M2 fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltam őket.

3.3 Genetikai szűrés

A genetikai szűréshez RNS-interferencia-törzseket rendeltünk három törzsközpontból (Vienna Drosophila Resource Center/VDRC; Bloomington Drosophila Stock Center/BDSC; National Institute of Genetics/NIG-Fly). Ezen a törzsek olyan UAS promóterrel meghajtható transzgéneket hordoztak, amelyek az adott célgént gátló duplaszálú RNS-t kódoltak. Ez alól egyedül az SREBP volt kivétel, amelyet a gén domináns negatív formáját túltermelő transzgén (UAS-SREBP[dN]) segítségével gátoltunk. Az RNSi törzsekből szedett hím állatokat ezután egy Sp/CyO, dfdYFP; UAS-Ras[V12], FRT82 Scrib[d2]/TM6c törzzsel kereszteztem. A keresztezésből kikelt állatok közül kiválogattam az RNSi/CyO, dfdYFP; UAS-Ras[V12], FRT82B Scrib[d2]/+ genotípusú hímekeket és MARCM szűzekkel kereszteztem, majd az ebből a keresztezésből kikelt lárvákban vizsgáltam a tumorokat. A boncolás előtt fluoreszcens sztereomikroszkópban ellenőriztem, hogy a lárvákban növekszenek-e a tumorok és mentesek-e a CyO-dfdYFP balanszer kromoszómától.

Az adott RNSi genotípusokból mindig 7-8 darab, 8 napos lárvából boncoltam ki a fejlődő szemet PBS-ben, melyeket aztán 4%-os formalin-PBS (FA-PBS) oldatban fixáltam 30 percen keresztül. A 2x öblítés, 1x15 perces mosást szintén PBS-sel végeztem a fixálószer eltávolításához, majd glicerinen fedtem le a mintákat. A tumorokat fluoreszcens mikroszkóppal 10x-es nagyításon optikai szeletelést (Z-stack funkció, 3 mikronos szeletvastagság) végezve teljes terjedelmükben lefotóztam.

3.4 Immuncitokémia

Az immuncitokémiai festés első napján PBS-ben kiboncoltam az RC, RS és RS ACC genotípusú, 6 napos lárvákból 7-8 db fejlődő szemet, majd a mintákat 20 percen keresztül fixáltam 4%-os formalin-PBS oldatban. A fixáló eltávolításához 3x5 percen keresztül mostam 0.5%-os Triton X100-PBS oldatban (PBT), majd hozzáadtam az elsődleges ellenanyagokat (**2. táblázat**), 5%-os szarvasmarha szérumot tartalmazó PBT-ben (FBS PBT). Ezután a minták 4°C-on inkubálódtak egy éjszakán át.

A második napon a mintákat 3x5 percig mostam PBT-ben, majd hozzáadtam az FBS PBT-ben oldott másodlagos ellenanyagokat és 3 órán át inkubáltam őket szobahőmérsékleten, lefóliázva. A másodlagos ellenanyagokat 2x5 perces PBT mosással távolítottam el, majd 2x5 percen keresztül PBS pufferben kimostam a mintákból a maradék detergenst. A mintákat 100%-os DAPI-glicerinen fedtem le, és valamennyi mintából fluoreszcens mikroszkóppal egy 7-7 szeletből álló képsorozatot készítettem (Z-stack), 0.35 µm-os szeletvastagsággal.

3.5 Ex vivo

A kísérlethez 10 µM olajsavat (#O3008, Merck) tartalmazó Shields és Sang-féle M3 rovar médiumot (#S8398, Merck) készítettem. A befertőződés elkerülése végett a kísérlethez steril 24 lyukú plate-t használtam, valamint a lárvákat és a csipeszek hegyét a boncolás előtt 70%-os etanolban megmostam. A vizsgálathoz RS, illetve RS ACC típusú tumorokat boncoltam ki M3 médiumban, majd genotípusonként 10-15 tumort inkubáltam 1-1 ml normál, vagy olajsavat tartalmazó M3 médiumban 24 órán keresztül 25°C-on, a fénytől elzárva. Az idő letelte után megvizsgáltam a tumorok méretét a már ismertetett, térfogatméréshez használt protokoll (lásd 3.3 és 3.8 alfejezet) alapján.

3.6 TMRM festés

A mitokondriumokat jelölő TMRM (tetrametil-rodamin-metil-észter) festés során a Yoon és munkatársai által¹⁶ alkalmazott protokollt követve, a TMRM festéket (#T668, Thermo) Shields és Sang-féle M3 rovar médiumban ((#S8398, Merck) hígítva 200 nM-os végkoncentrációban használtam. A festéshez 6 napos RS, RC, RS ACC és PISD RNAi-t kifejező RS tumorokat (genotípusonként 5-6-ot) kiboncoltam ki M3 médiumban, majd 20 percen keresztül inkubáltam a mintákat a festékoldatban. A festéket ezután 3x10 perces PBS-es mosással távolítottam el, majd a mintákat 40 percen keresztül fixáltam 4% formalin-PBS oldatban. A fixálót 2x10 perces PBS

mosással távolítottam el, majd a mintákat glicerinben lefedve, azonnal megvizsgáltam fluoreszcens mikroszkóppal. A képalkotás során valamennyi mintából egy 7-7 szeletből álló képsorozatot (Z-stack funkció, 0.35 μm -os szeletvastagság) készítettem.

3.7 Western blot

A kísérletekhez 8 napos lárvákból gyűjtöttünk tumorokat jégen tartott lízis puffert (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, és 5 mM EDTA) tartalmazó Eppendorf csövekbe. A lízis puffer proteáz (PMSF 1:100, leupeptin 1:1000, aprotinin 1:1000) és foszfatáz (NaF 1:100, Na_3VO_4 1:100) inhibitort is tartalmazott. A méretkülönbség miatt 30 μl lízispufferbe az RS tumorokból 5 az RS ACC-kból pedig 10 db-ot gyűjtöttünk. Ezt követően a mintákat műanyag kézi homogenizáló pálca segítségével homogenizáltuk, majd Bradford reagenssel megmértük a fehérjetartalmukat. Végül 6xLaemmli töltő puffer hozzáadását követően a mintákat 5 percig forraltuk, majd felhasználásig -20°C -os fagyaszóban tároltuk.

A western blot kísérlet során 12%-os poliakrilamid gélen mintánként 7,5-7,5 μg fehérjét tartalmazó mennyiséget futtatunk meg, majd a lefutott gélből a fehérjéket Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) berendezés segítségével vittük át PVDF membránra. A membránt ezt követően 0,1% Tween-20 detergenst tartalmazó TBS pufferben (TBST) mostuk 3x5 percet, majd egy órán át blokkoltuk 0,5% kazeinben. Ezt követően a membránt a megfelelő fehérjeméret-tartomány szerint több darabra vágtuk, majd az egyes darabokat különböző elsődleges ellenanyagokat (**2. táblázat**) tartalmazó 1:1 TBST-Kazein oldatban inkubáltuk egy éjszakát 4°C -on billegtetve. Másnap a membránokról 3x10 perc TBST-s mosással távolítottuk el az elsődleges ellenanyagot, majd egy órát inkubáltuk őket tormaperoxidáz (HRP) konjugált másodlagos ellenanyagot tartalmazó Kazein-TBST-ben szobahőn. Ezt újabb 3x10 perces TBST-s mosás követte, majd a membránt Chemiluminescent HRP szubsztrát oldattal kezelve hívtuk elő Chemidoc Imaging System (Bio-Rad) berendezés segítségével. A kísérleteket denzitometrálással értékeltük ki. Ennek során az adott band-ek intenzitását mértük meg az ImageJ szoftver Gels funkciójának használatával.

Immuncitokémia				
Elsődleges ellenanyagok	Ellenanyag típusa	Hígítás	Gyártó	Azonosító szám
nyúl anti-PH3	poliklonális	1:500	Merck	#06-570
nyúl anti-GABARAP+L1+L2 (Drosophila Atg8a-t felismeri)	monoklonális	1:300	Abcam	# ab109364
Másodlagos ellenanyagok				
anti-nyúl	Alexa 568-konjugált	1:1000	LifeTechnologies	#A-11036
Western blot				
Elsődleges ellenanyagok				
egér anti-tubulin	monoklonális	1:1000	Developmental Studies Hybridoma Bank	#AA4.3
nyúl anti-P-p44/42 MAPK (Drosophilaban is felismeri a P-Erk-et)	poliklonális	1:1000	ThermoFisher	#4370S
egér anti-P-p70 S6-kináz	poliklonális	1:1000	Cell Signaling Technology	#9206S
nyúl anti-GABARAP+L1+L2 (Drosophila Atg8a-t felismeri)	monoklonális	1:5000	Abcam	#ab109364
Másodlagos ellenanyagok				
anti-nyúl	tormaperoxidáz-konjugált	1:2500	Dako	#P0217
anti-egér	tormaperoxidáz-konjugált	1:10000	Sigma	#A9044

2. táblázat: Az immuncitokémiai festések és Western blot eljárások során alkalmazott ellenanyagok.

3.8 Statisztika

Tumortérfogat meghatározás

A genetikai szűrés eredményeit a Fiji ImageJ képfeldolgozó program segítségével számszerűsítettem. Ehhez először az adott tumorról optikai szeleteléssel készült képsorozatból levágtam a szélső szeleteket és csak azokat tartottam meg, amelyek együttesen lefedték az adott tumor teljes térfogatát, majd az így megvágott képsorozaton lefuttattam egy általunk megírt makró. A makró megírásakor a maszk létrehozásánál a beépített „Otsu” küszöbérték számítási modellt és az „auto treshold”-beállítást alkalmaztuk, mely minden képszeletre egy maszkot hoz létre, ami azokat a pontokat jelöli, ahol elég erős a színintenzitás a tumoros területeket jelölő zöld csatornán. A Fiji a maszkolt képeken látható tumoros területeket jelölő mezőkből 3D-s

objektumokat készít, és leméri azok térfogatát. Ezen objektumok térfogatát összeadva megkaptam, hogy mekkora a lemért tumor össztérfogata. Az össztérfogatok értékeiből a GraphPad Prism programban készítettem statisztikát, miután Shapiro-Wilk teszttel megállapítottam, hogy az adataim normál eloszlásúak. A statisztikai vizsgálatokat ábrázoló diagramokon a szignifikancia értékeket a következőképpen jelöltük: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

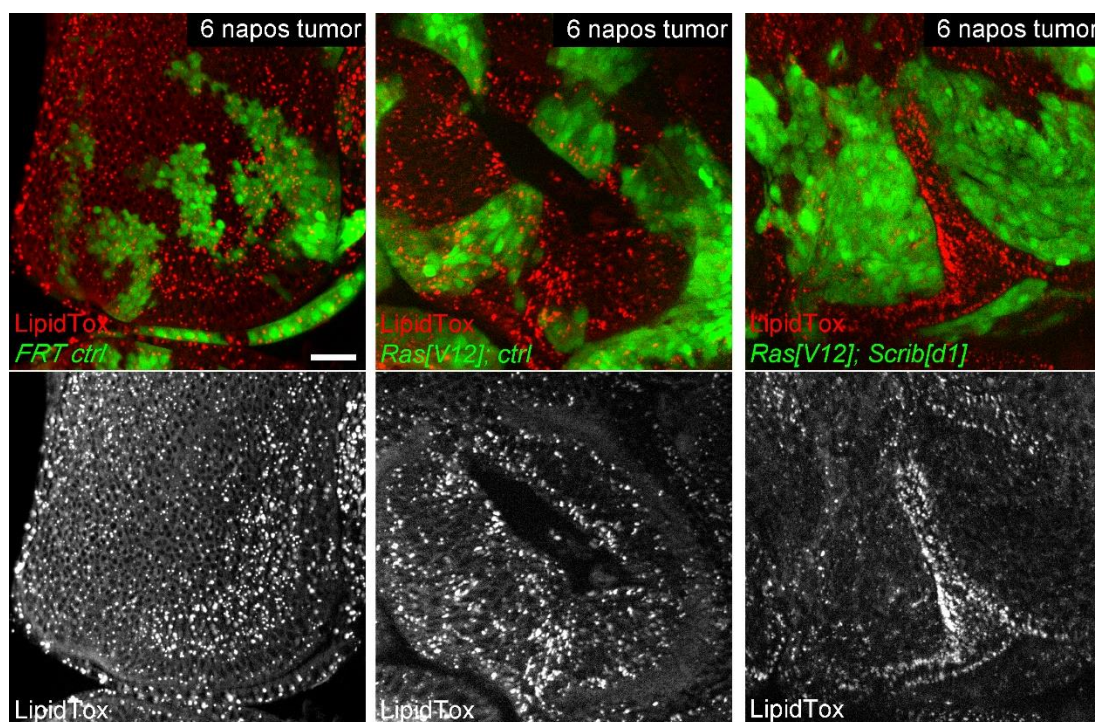
Osztódó sejtmagok számszerűsítése

Az immuncitokémiai festések eredményeit szintén a Fiji ImageJ képfeldolgozó program segítségével értékeltem ki. Az RS és RS ACC genotípusú állatokról készült képsorozatokon lefuttattam egy másik, szintén általunk megírt makrót, melynek segítségével összehasonlítottam a GFP-pozitív, illetve GFP-negatív területeken az osztódó sejtmagok számát. A GFP-pozitív területeken itt is az „Otsu”, míg a GFP-negatív területeken a szintén beépített „Li” maszkolási modellt alkalmaztuk. A makró lefuttatása után megkaptam a minták osztódó sejtmagjainak számát, melyeket a Python-program segítségével a sejtmagok átlagméretével korrigáltam, hogy az összeolvasztott sejtmagokat külön tudjam számolni, illetve a minta méretével is korrigáltam. Az eredményeket táblázatos formában összesítettem, illetve csoportosított oszlopdiagramon ábrázoltam (7. ábra).

4. Eredmények és megvitatásuk

4.1 A lipid anyagcsere szerepe a tumorban

Számos rosszindulatú tumor típusról ismert, hogy megváltozik bennük a lipid metabolizmus¹⁷. Annak megerősítésére, hogy ez a jelenség az általunk használt tumormodellre is jellemző, LipidTOX festékkel vizsgáltam meg a bennük található lipidcseppek mennyiségét és eloszlását. Az eredmények alapján azt tapasztaltam, hogy a GFP+ normál vad típusú (FRT kontroll) és a jóindulatú tumoros (RC) sejtekben hasonló mennyiségű és méretű lipidcsepp volt megfigyelhető, mint a mikrokörnyezetet alkotó, GFP-t nem kifejező sejtekben. Ezzel szemben a rosszindulatú rákos sejtekben kevesebb lipidcseppet figyeltem meg a mikrokörnyezeti sejtekhez képest (**3. ábra**). Ez arra utal, hogy a rosszindulatú elváltozás az általunk vizsgált tumorok esetében is a rákos sejtek lipid anyagcseréjének megváltozásához vezet.

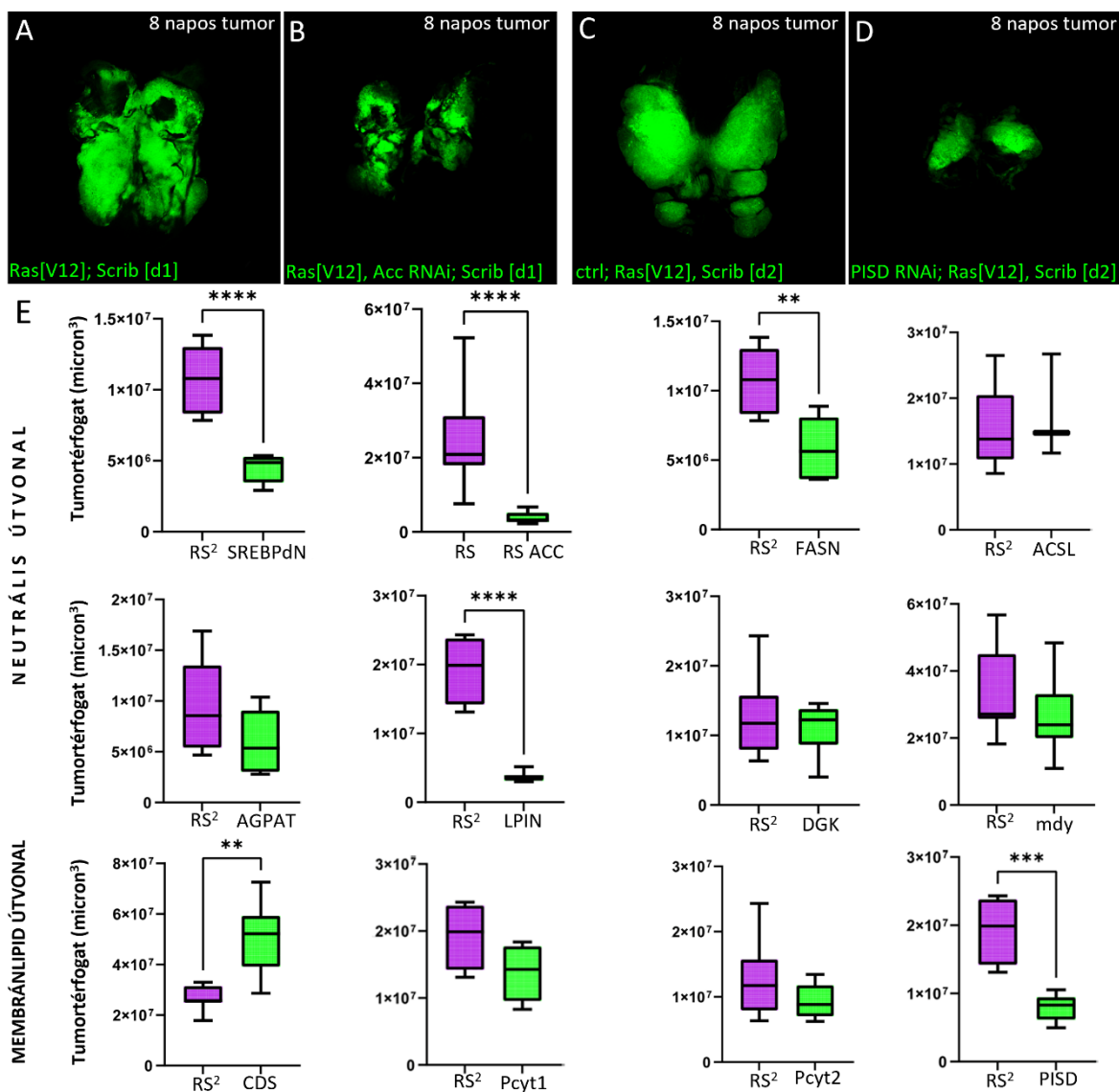


3. ábra: A rosszindulatú Ras[V12]; Scrib[d1] (RS) tumorban megfigyelhető a GFP+ területeken a lipidcseppek számának csökkenése a GFP- mikrokörnyezethez, illetve a normál szövetekhez (FRT ctrl) és jóindulatú Ras[V12]; ctrl tumorhoz (RC) képest. A skála 20 μ m.

4.2 Genetikai szűrés

A lipidszintézis tumorprogresszióban betöltött szerepének további feltárása érdekében egy kisléptékű genetikai szűrést végeztünk. A lipidszintézis egyes komponenseit szisztematikusan

csendesítettük RNSi-vel, és nyomon követtük a tumor méretére gyakorolt hatásukat (**4. ábra**). Ez lehetővé tette, hogy meghatározzuk a lipidszintézis útvonalának kulcsfontosságú szereplőit, melyek hozzájárulnak a tumor növekedéséhez.



4. ábra: A genetikai szűrés eredményeit bemutató ábra. Az első 4 panelen az a két genotípus látható a saját kontrolljához hasonlítva (A-B és C-D), melyek a további kísérleteink főszereplői voltak. (E) A genetikai szűrés eredményét mutató diagramok, a vizsgált gént csendesítő (zöld oszlopok) és a hozzájuk tartozó kontrol tumorok méretének összehasonlítása.

Azt figyeltük meg, hogy a neutrális lipidek szintéziséhez szükséges enzimek többségének hiányában szignifikánsan csökkent a tumortérfogat. A DAG szintéziséhez szükséges komponensek közül csak az ACSL illetve AGPAT enzimek nem adtak szignifikáns különbséget. A hatás hiánya vélhetően mindkét esetben arra vezethető vissza, hogy *Drosophila*

genomban számos ACSL és AGPAT ortológ és paralóg található, amelyek képesek kompenzálni a csendesített gének funkcióját^{18,19}.

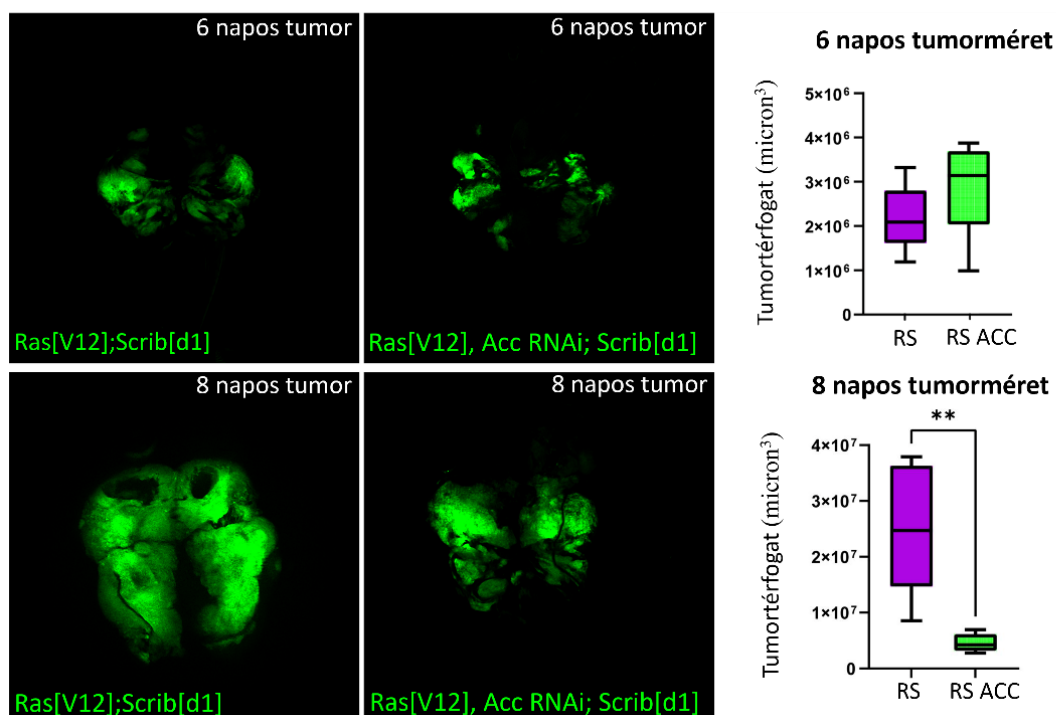
Érdekes módon a sejtmembránok legfontosabb membránlipidjeit (PE és PC) előállító fő útvonalak nem voltak szükségesek a tumor progressziójához. Ellenben egy, a PE-t létrehozó alternatív útvonal elrontásával, melyben a PISD enzim vesz részt, szignifikánsan csökkent a tumorok mérete.

Érdekes megfigyelésünk volt még, hogy CDS csendesítésekor a kontrolljához képest a tumor térfogatának jelentős növekedését tapasztaltuk, míg a LPIN hiányában nagymértékben csökkent a tumorméret. A jelenségre egy lehetséges magyarázat lehet, hogy mindkét enzim a foszfátidsavat használja szubsztrátként, és a CDS hiányában a teljes foszfátidsav mennyiséget a LPIN tudja feldolgozni, amely végső soron így a tumor növekedését támogatja.

4.3 Az ACC tumornövekedésre gyakorolt hatásának lehetséges sejtbiológiai okai

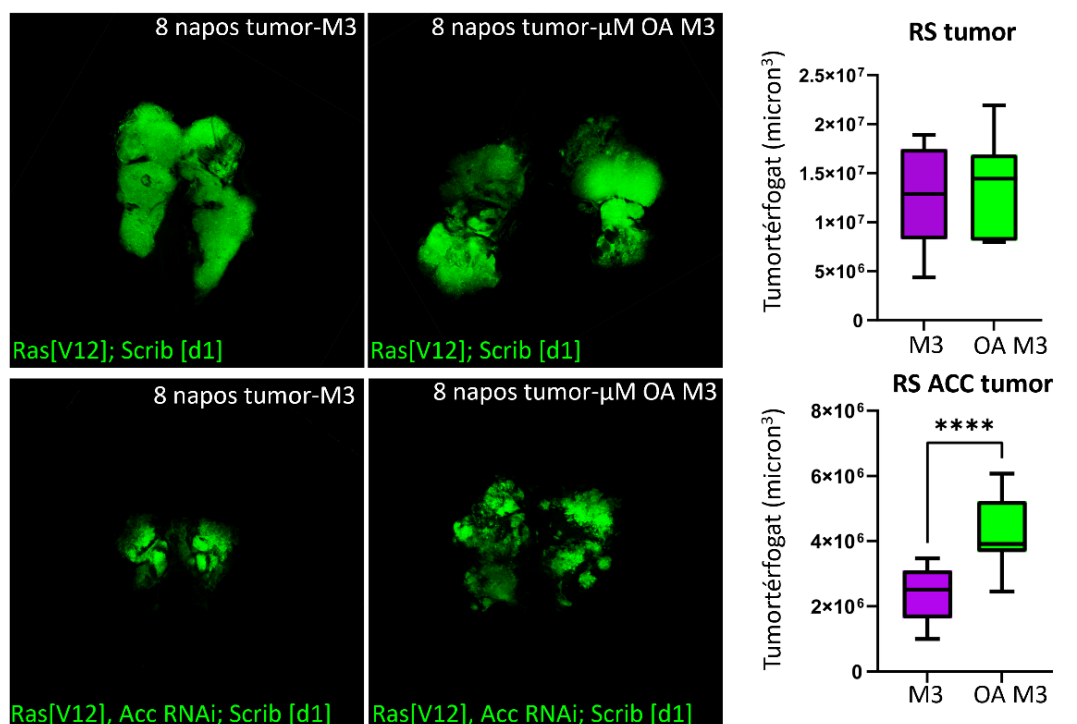
Mivel megállapítottuk, hogy a lipidszintézis valóban kritikus tényező a tumor növekedéséhez, a továbbiakban a folyamat leginkább upstream elhelyezkedésű enzimével, az ACC-vel folytattuk a vizsgálatainkat.

A genetikai szűrés kezdetén, az ACC vizsgálatakor megnéztük a tumortérfogatot 6, illetve 8 napos lárvákban is. Azt tapasztaltuk, hogy az ACC elvesztése nem befolyásolta a korai stádiumú (6. nap) tumorok méretét. Ezzel szemben a késői stádiumú tumorok növekedése (8. nap) nagymértékben csökkent az ACC hiányában **(5. ábra)**. Ez arra utal, hogy az ACC-nek kifejezetten a tumor későbbi stádiumára jellemző, nagymértékű méretnövekedés során van szerepe.



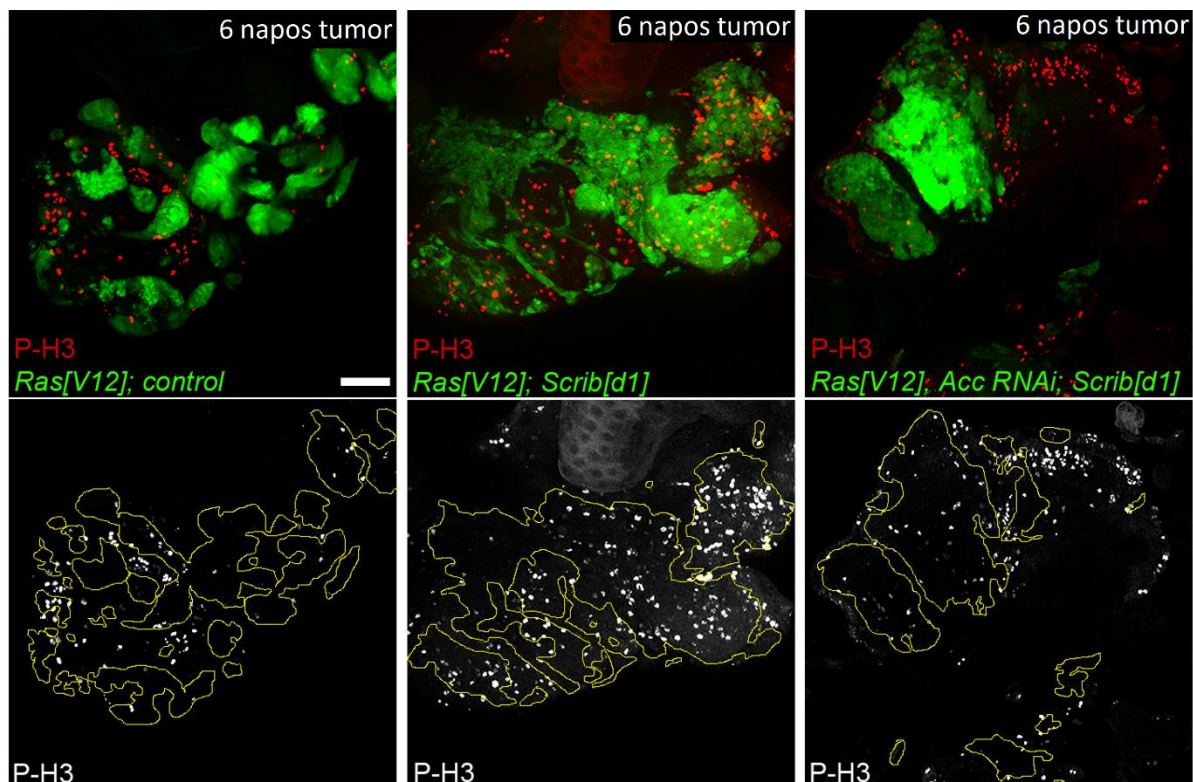
5. ábra: A korai (6 napos) illetve késői (8 napos) stádiumú tumorok térfogatának összehasonlítása a lipidszintézis hiányában.

Annak megfigyelésére, hogy a zsírsav szintézistől megfosztott, késői stádiumú tumor növekedése helyreállítható külső forrásból biztosított lipidbevitel esetén, kifejlesztettünk egy eljárást, amely során a tumorokat ex vivo körülmények között tudtuk fenntartani M3 szövettenyésztő médiumban. A kísérlet során 7 napos lárvákból kiboncolt RS és RS ACC tumorokat inkubáltunk normál M3, valamint olajsavval dúsított M3 médiumban, és azt figyeltük meg, hogy az olajsav jelenlétében a lipidszintézis hiányos RS ACC tumorok szignifikánsan nagyobbra nőttek, mint a normál médiumban tartottak. Ezzel szemben a lipidszintézisre képes RS tumorok növekedését nem befolyásolta a hozzáadott olajsav (**6. ábra**). Ez az eredmény arra utal, hogy a lipidek elérhetősége kritikus tényező a tumor növekedésének fenntartásában és az RS ACC tumorok kisebb mérete valóban a rendelkezésre álló zsírsavak alacsony szintjének tudható be.

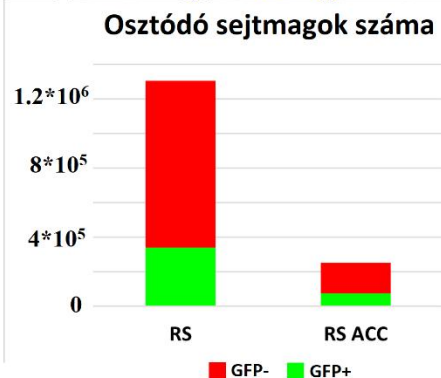


6. ábra: Az ex vivo kísérlet eredményeit bemutató ábra, az olajsavas kezelés hatása a rosszindulatú kontrol (RS), illetve ACC-hiányos tumorok térfogatára.

Annak felmérésére, hogy az ACC-hiányos tumorokban a késői stádiumban megfigyelt tumorméret-csökkenés a korlátozott sejtosztódás eredménye-e immunfestést végeztünk. Azt találtuk, hogy mind az RS és az RS ACC tumorokban egyaránt megnőtt az osztódó sejteket jelölő foszfo-hisztón 3 (P-H3) (7. ábra) szintje a jóindulatú RC-tumorokhoz képest. Ugyanakkor az RS, illetve RS ACC tumorok összevetése során az utóbbiakban a tumoros területeken jelentősen kevesebb P-H3 jelet figyeltünk meg. A festés eredményének számszerűsítését követően arra jutottunk, hogy a korlátozott sejtosztódás állhat az ACC-hiányos tumorok térfogatcsökkenésének hátterében (7. ábra).



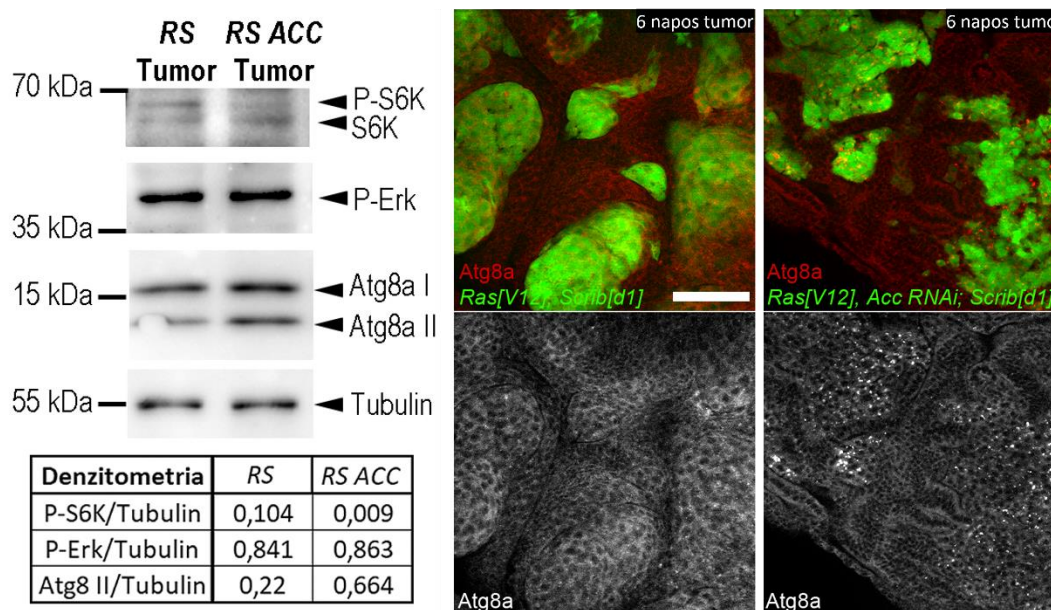
Osztódó sejtmagok száma a rosszindulatú tumorban		
	RS	RS ACC
GFP+	2620 db	227 db
GFP-	3072 db	2350 db
A minta méretével korrigált arányszám (mm ³)		
GFP+	339001 db	75022 db
GFP-	964871 db	175836 db



7. ábra: Az RS ACC tumorok méretbeli csökkenése a korlátozott sejtosztódásnak köszönhető. A térfogategységre vetített osztódó sejtek száma csökken az ACC-hiányos tumorok GFP+ területein a normál RS tumorok GFP+ területeihez képest. A skála 20 μ m.

Miután kimutattuk, hogy az ACC-hiányos tumorokban korlátozott a sejtosztódás, annak megállapítására, hogy ez betudható-e valamelyik osztódást és növekedést szabályozó jelátviteli útvonal működési zavarának, Western-blot analízist végeztünk. A TOR jelátviteli útvonal fontos szerepet játszik a sejtek tápanyag-ellátottságának érzékelésében, a sejtproliferációban, valamint kölcsönhatásban áll az osztódást szintén szabályozó MAPK-útvonallal és az autofágiával²⁰, így ezek szerepét vizsgáltuk RS illetve RS ACC tumorokban. A Western blot elemzés kimutatta, hogy az ACC hiányában csökkent a TOR szubsztrát S6 Kináz foszforilációjának szintje, amely a TOR csökkent működésére utal. Emellett az Atg8 fehérje

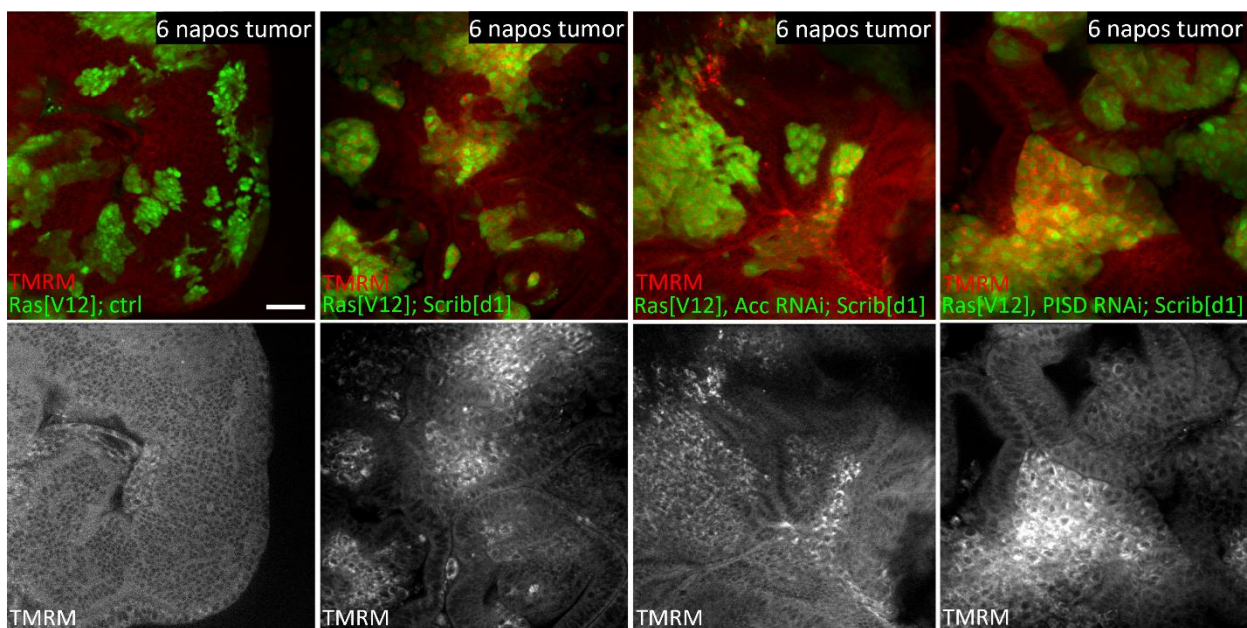
lipidált formájának (Atg8 II) szintje is megemelkedett, ami az autofágia fokozódó aktivitását és ugyancsak a TOR inaktivitását jelzi (**8. ábra**). Ezzel szemben a MAPK-útvonal aktivitását jelző foszfo-ERK szintje nem mutatott eltérést a két tumor között. Azon eredményünket, miszerint a lipidszintézis sérülése indukálja az autofágiát, egy újabb immunfestéssel is igazoltuk (**8. ábra**), amely során az RS ACC tumorokban az Atg8a pozitív autofág struktúrák megemelkedett szintjét figyeltük meg.



8. ábra: A Western blot eredményei azt mutatják, hogy az ACC-hiány csökkent TOR-aktivitással jár együtt. A P-Erk vizsgálatánál nem figyeltünk meg különbséget az RS és RS ACC tumorok között. Az Atg8 lipidált formájának (Atg8 II) magasabb jelenléte az ACC-hiányos tumorban arra utal, hogy az autofágia indukálódik ha a lipidszintézis sérül. Fluoreszcens immunjelöléses mikroszkópiával ugyancsak az Atg8a pozitív autofág struktúrák emelkedett szintjét figyeltük meg az RS ACC tumorokban. A skála 20 μm.

4.4 A lipid anyagcsere és a mitokondriális rendszer kapcsolatának vizsgálata

A PISD a mitokondriumokban a PS PE-á való átalakításában vesz részt. Korábbi tanulmányokban már leírták, hogy gátlása csökkentette a rákos sejtek proliferációját^{21,22}. Azt követően, hogy a genetikai szűrés során mi is megállapítottuk a PISD kiemelt szerepét a tumor növekedésében, mivel a PISD a mitokondrium belső membránjában található enzim, a lipidszintézis és a mitokondriális rendszer közötti összefüggés feltárásával folytattuk a kutatásunkat. Ehhez a mitokondriumok membránpotenciálját jelölő TMRM festést végeztünk, hogy láthatóvá tegyük a mitokondriális aktivitást a különböző genotípusú tumorokban.



9. ábra: A mitokondriális aktivitás vizsgálata a RC, RS, RS ACC illetve RS PISD tumorokban. Látható, hogy a normál és a lipidszintézis hiányos rosszindulatú tumorok rákos sejtjeiben (GFP+), jóval intenzívebb a TMRM festés a jóindulatú RC tumorhoz képest. A skála 20 μ m.

A jóindulatú daganatokban (RC) a mitokondriumok festési mintázata homogén, egyenletes eloszlású volt, mind a tumor (GFP+) mind pedig a mikrokörnyezetüket alkotó egészséges (GFP-) sejtjeiben. Ezzel szemben a normál rosszindulatú (RS), valamint azokban, ahol a lipidszintézis sérült (RS ACC, PISD) tumorok rákos (GFP+) sejtjeiben a mitokondriumok festődése jelentősen intenzívebb jelet mutatott. Ez arra utal, hogy a rosszindulatú tumorokban megnövekedik a mitokondriális aktivitás, ugyanakkor a lipidszintézis hiánya ezt közvetlenül nem befolyásolja. Fontos azonban szem előtt tartani, hogy a TMRM festéssel alapvetően a sejteken belüli mitokondriális membránpotenciált ($\Delta\Psi_m$) lehet vizualizálni, mely a mitokondriális membránok általános állapotáról és polarizációjáról ad információt, azonban a festődés intenzitásának a növekedéséből nem derül ki, hogy a légzési lánc fokozott működése vagy a megnövekedett energiatermelés áll fenn.

Összegzés

Munkánk rávilágít a lipid metabolizmus, mitokondriális aktivitás, illetve a rák progressziója közötti összetett kölcsönhatásokra. Az itt bemutatott kísérletek azt sugallják, hogy a lipid anyagcsere kiemelkedő szerepet játszik a késői stádiumú daganatok növekedésében. Az elvégzett genetikai szűrés során kimutattuk, hogy a neutrális lipidszintézis útvonal komponensei az utolsó, diacilglicerinből triacilglicerint létrehozó lépést leszámítva nélkülözhetetlenek a tumor potenciális méretének eléréséhez. Érdekes módon a membránlipidek esetében egyelőre úgy tűnik, hogy csak a mitokondriális PISD enzim játszik kiemelkedő szerepet. A DAG-ek számos membránlipid szintézisének kiinduló pontjai, így a PISD szubsztrátjának számító foszfatidil-szerinnek is. Így összességében eredményeink azt sugallják, hogy a rosszindulatú tumorokban a lipidszintézis fő célja, hogy a PISD útvonalon keresztül megfelelő membránlipid, főleg foszfatidil-etanolamin keletkezzen.

Eredményeink arra utalnak, hogy ACC hiányában a korlátozott sejtosztódásnak köszönhető a kisebb tumorméret, amellyel összefügghet a TOR jelátviteli útvonal általunk megfigyelt csökkent működése. Az ACC gátlásának egyik lehetséges hatása, hogy ellehetetlenül a tumorsejtek hatékony sejtosztódáshoz szükséges membránlipidek, például a PE előállítása. E képbe jól illik a mitokondriumokban PE-t előállítani képes PISD általunk megfigyelt fontos szerepe a tumornövekedésben, valamint az általunk szintén tapasztalt mitokondriális aktivitásnak az emelkedése a rosszindulatú daganatokban.

Összességében kutatásaink rámutatnak a neutrális lipid és a PISD által mediált PE szintézis útvonalak közötti lehetséges kapcsolatra a tumornövekedés során. Ezek a tumorok anyagcseréjének olyan érzékeny pontjai, amelyek növekedésükhöz elengedhetetlenek, és amelyek külön-külön vagy együttes gátlása jó kiindulópont lehet a jövőbeli tumorelleses módszerek kifejlesztéséhez.

Köszönetnyilvánítás

Elsőként témavezetőmnek, Dr. Takáts Szabolcsnak szeretnék köszönetet mondani a közös munkáért, a dolgozatom elkészítése során nyújtott tanácsaiért és végtelen türelméért.

Köszönettel tartozom Pálfia Saroltának, Neuhauser Natalinak, illetve Szenci Győzőnek, akik állandó jelenlétükkel és észrevételeikkel segítették a munkámat.

Szeretnék köszönetet mondani Bótor Bálint Sólyomnak a statisztikai kiértékelésekben és a makrók megírásában nyújtott minden segítségéért.

Végezetül hálás vagyok az Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék minden munkatársának a segítőkészségükért és az általános jó hangulatért.

Irodalom

1. Cheng, C. *et al.* (2018) 'Lipid metabolism reprogramming and its potential targets in cancer', *Cancer Communications*, 38(1), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40880-018-0301-4>.
2. Bian, X. *et al.* (2021) 'Lipid metabolism and cancer', *Journal of Experimental Medicine*, 218(1). Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20201606>.
3. Peck, B., & Schulze, A. (2016). Lipid desaturation – the next step in targeting lipogenesis in cancer? *The FEBS Journal*, 283(15), 2767–2778. <https://doi.org/10.1111/febs.13681>
4. Ferraro, G.B. *et al.* (2021) 'Fatty acid synthesis is required for breast cancer brain metastasis', *Nature Cancer*, 2(4), pp. 414–428. Available at: <https://doi.org/10.1038/s43018-021-00183-y>.
5. Koundouros, N., & Poulogiannis, G. (2020). Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. In *British Journal of Cancer* (Vol. 122, Issue 1, pp. 4–22). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0650-z>
6. Hua, H. *et al.* (2019) 'Targeting mTOR for cancer therapy', *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1), p. 71. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0754-1>.
7. Popova, N. V. and Jücker, M. (2021) 'The Role of mTOR Signaling as a Therapeutic Target in Cancer', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), p. 1743. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22041743>.
8. Mirzoyan, Z., Sollazzo, M., Allocca, M., Valenza, A. M., Grifoni, D., & Bellosta, P. (2019). *Drosophila melanogaster*: A Model Organism to Study Cancer. *Frontiers in Genetics*, 10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00051>
9. Morata, G. and Calleja, M. (2020) 'Cell competition and tumorigenesis in the imaginal discs of *Drosophila*', *Seminars in Cancer Biology*, 63, pp. 19–26. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.06.010>.
10. Igaki, T., Pagliarini, R.A. and Xu, T. (2006) 'Loss of Cell Polarity Drives Tumor Growth and Invasion through JNK Activation in *Drosophila*', *Current Biology*, 16(11), pp. 1139–1146. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.04.042>.
11. Germani, F., Bergantinos, C. and Johnston, L.A. (2018) 'Mosaic Analysis in *Drosophila*', *Genetics*, 208(2), pp. 473–490. Available at: <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300256>.

12. Herranz, H., & Cohen, S. (2017). *Drosophila* as a Model to Study the Link between Metabolism and Cancer. *Journal of Developmental Biology*, 5(4), 15. <https://doi.org/10.3390/jdb5040015>
13. Dillard, C., Reis, J. G. T., & Rusten, T. E. (2021). RasV12; scrib^{-/-} tumors: A cooperative oncogenesis model fueled by tumor/host interactions. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 16). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22168873>
14. Mundorf, J., & Uhlirova, M. (2016). The *Drosophila* Imaginal Disc Tumor Model: Visualization and Quantification of Gene Expression and Tumor Invasiveness Using Genetic Mosaics. *Journal of Visualized Experiments*, 116. <https://doi.org/10.3791/54585>
15. Cheng, L., Baonza, A., & Grifoni, D. (2018). *Drosophila* Models of Human Disease. *BioMed Research International*, 2018, 1–2. <https://doi.org/10.1155/2018/7214974>
16. Yoon, W. *et al.* (2019) ‘*Drosophila* ADCK1 is critical for maintaining mitochondrial structures and functions in the muscle’, *PLOS Genetics*, 15(5), p. e1008184. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008184>.
17. Zheng, M. *et al.* (2021) ‘Lipid Metabolism in Cancer Cells’, in, pp. 49–69. Available at: https://doi.org/10.1007/978-981-33-6785-2_4.
18. Heier, C., & Kühnlein, R. P. (2018). Triacylglycerol Metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 210(4), 1163–1184. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.301583>
19. Watkins, P. A., Maignel, D., Jia, Z., & Pevsner, J. (2007). Evidence for 26 distinct acyl-coenzyme A synthetase genes in the human genome. *Journal of Lipid Research*, 48(12), 2736–2750. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700378-JLR200>
20. Pópulo, H., Lopes, J.M. and Soares, P. (2012) ‘The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer’, *International Journal of Molecular Sciences*, 13(2), pp. 1886–1918. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms13021886>.
21. Keckesova, Z. *et al.* (2017) ‘LACTB is a tumour suppressor that modulates lipid metabolism and cell state’, *Nature*, 543(7647), pp. 681–686. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature21408>.
22. Pandey, S.K. *et al.* (2021) ‘SMAC/Diablo controls proliferation of cancer cells by regulating phosphatidylethanolamine synthesis’, *Molecular Oncology*, 15(11), pp. 3037–3061. Available at: <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12959>.