

國立臺灣大學生命科學院分子與細胞生物學研究所



碩士論文

Institute of Molecular and Cellular Biology

College of Life science

National Taiwan University

Master Thesis

BAD 磷酸化狀態反應粒線體活性進而調控細胞生長之機制探討

The phosphorylation state of BAD corresponds to mitochondrial
metabolism and regulates cell growth

顏宏家

Hong-Jia Yan

指導教授：柯逢春 博士

Advisor: Ferng-Chun Ke, Ph.D.

中華民國 103 年 1 月

January, 2014

致謝



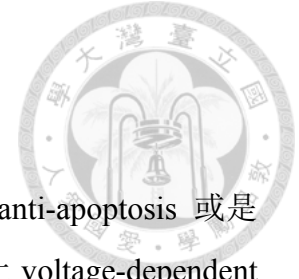
能夠完成本篇論文，首先我要感謝柯逢春老師。再來要感謝擔任我的口委的黃火鍊老師，黃娟娟老師，李明亭老師，和蕭培文老師，為我的論文提出精闢的建議，開拓我對研究更深的視野。

接著要感謝在我的碩士生涯中一起努力過的實驗室成員耕佑學長、珮汝、培任、祐任，還有前實驗室成員姚婉恕。真的很謝謝耕佑學長這幾年來的照顧和盡心盡力的指導，總是在我做蠢事以後幫忙收拾爛攤子，然後為我指引出實在的實驗方向，可比是黑暗中的一盞明燈，口試前的最後兩個月更是辛苦的幫忙我，如果沒有你的幫忙，我應該會一直陷在束手無策的絕望中吧。學長真的是一個很可靠的人，未來一定是個好丈夫和好爸爸！祝福你的 paper 能夠很快的被 accept，早日完成博士學位。然後是我的好夥伴珮汝，在你畢業後更深刻體會到你的好，能有人一起努力還有一起分(ㄉㄤ)憂(ㄌㄢ)是件幸福的事，也謝謝你不時的關心我的近況，能跟你當同屆同實驗室的同學應該是我上輩子有積一點陰德。再來要謝謝姚婉恕總是為我加油打氣，我只能說以過來人的身分講真的很有說服力，很喜歡你下班後來 744 找我們瞎哈啦，聊八卦，每次開懷大笑以後真的抒發了很多焦慮，我想這會是多年後我記憶中最鮮明的快樂時光，也很感激你每次團購都會多訂一份拿來給我們吃，解救了我好幾次快餓扁的窘境。然後祐任你實驗加油，相信很快就會有不錯的成果，加油！

我還要感謝一直默默支持我的家人，回家總是能讓我找回那份失去的安心感，也要感謝其他好朋友，你們大部分都比我先踏上人生的下一段路，所以能給我許多很不錯的建議，謝謝你們。

這幾年在台北的生活，讓我了解到很多事情，卻也對很多事情更加的迷惘，這段日子就像一座過長的橋，除了跳河就只能不斷的往前走，我不知道碩士生涯花費的時間是否讓我得到等值的收穫，但是我期待在未來的日子裡，我會發現到它帶給我的意義，可以確定的是這段日子是我人生中重要的接軌，它的結束代表即將邁向下一個更重要的旅途，希望以後幸運之神可以多眷顧我一些，我也努力讓自己變得更強壯，更值得依靠，為未來的自己加油吧！keep fighting！

中文摘要

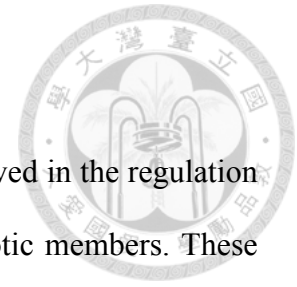


一般而言，我們對 Bcl-2 family protein 的認知都是它們 anti-apoptosis 或是 pro-apoptosis 的功能，會因為彼此的交互作用，調控粒線體外膜上 voltage-dependent anion channel (VDAC) 的通透性，決定細胞的生死。但是近年來的研究逐漸注意到 Bcl-2 family protein 的另外一面，除了調控 apoptosis 以外，Bcl-2 family protein 也影響很多細胞重要的代謝作用。

BAD 是 Bcl-2 family 的一員，屬於 pro-apoptotic 的 BH3-only protein，會與粒線體外膜上的 Bcl-2, Bcl-xL 結合，造成 VDAC 的通透性增加，BAD 會在粒線體外膜上形成 BAD complex，BAD complex 會調控肝細胞 glucokinase 活性和 beta-cells 的 insulin secretion。暗示我們 BAD 可能在細胞的營養代謝層面上有所調控。而生長中細胞的營養可得性由粒線體 anaplerosis 整合。為了探討 BAD 活性與 anaplerosis 的關聯性，我們對細胞處理 anaplerosis 抑制劑 Aminoxyacetic acid (AOA)，發現 BAD 的磷酸化狀態改變，p-BAD(S136) 上升，p-BAD(S155) 下降；對細胞處理 glutaminolysis inhibitor, BPTES 也得到相同的實驗結果，證明 BAD 的磷酸化狀態反應粒線體 anaplerosis 活性。而當我們處理 soluble adenylyl cyclase inhibitor, KH7，BAD 磷酸化狀態的改變與抑制 anaplerosis 相同，說明粒線體 anaplerosis 活性可能經由 cAMP-PKA signaling 在 BAD complex 進行整合。此外 AOA, BPTES, KH7 處理皆觀察到 p-S6K1(T389) 下降，p-Akt(S473) 上升的現象，分別代表 mTORC1 活性下降，mTORC2 活性上升，mTORC2 對 Akt(S473) 的活化發生於 membrane raft，會進而活化 p-BAD(S136)，可能借此調控 BAD complex 中的 WAVE-1，造成粒線體到細胞膜 nutrient transporter 附近獲取胺基酸，促進粒線體進行 anaplerosis 然後產生 cAMP-PKA 訊號來活化 p-BAD(S155)。根據以上實驗結果，證明 BAD 的磷酸化狀態會反應粒線體 anaplerosis 活性，其中可能是由 BAD complex 來整合 cAMP-PKA signaling，然後造成 mTORC1 和 mTORC2 活性受到影響，藉此調控細胞的營養代謝與生長。

關鍵字: 粒線體; BAD; BAD complex; VDAC; Akt; cAMP-PKA signaling; anaplerosis; AOA; BPTES; KH7

Abstract

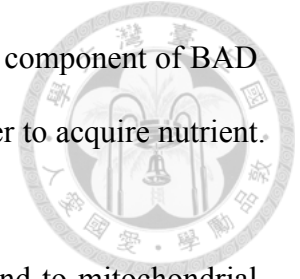


The Bcl-2 family is the best characterized protein family involved in the regulation of apoptotic cell death, consisting of anti-apoptotic and pro-apoptotic members. These proteins determine the life or death of cells by altering the VDAC permeability, which is located on the mitochondrial outer membrane. However, recent studies suggest that bcl-2 family proteins have cellular functions beyond regulation of apoptosis.

The BAD protein is a pro-apoptotic member of Bcl-2 family whose ability to heterodimerize with Bcl-2 and Bcl-xL, and increase permeability of VDAC. On the mitochondrial outer membrane, Bad assemble a complex together with PKA, PP1c, WAVE-1, and glucokinase. BAD complex and the phosphorylation state of BAD regulate the glucokinase activity in hepatocytes and the insulin secretion in beta cells, raising the possibility that BAD may be involved in nutrient metabolism. The mitochondrial anaplerosis activity is in response to cellular nutrient availability. To investigate the interaction between BAD activity and anaplerosis, we treated U2OS cells with anaplerosis inhibitor, aminooxyacetic acid(AOA), and measured the phosphorylation levels of BAD. We found that AOA induces BAD(S136) phosphorylation and reduces BAD(S155) phosphorylation. The treatments with BPTES result in the same BAD phosphorylation state, suggest that BAD phosphorylation states correspond to mitochondrial anaplerosis activity. In addition, soluble adenylyl cyclase inhibitor, KH7 treatments have the same effect. Suggest that mitochondrial anaplerosis activity may be coordinated by BAD complex through the cAMP/PKA signaling.

Treatment with AOA, BPTES, KH7, both reduce the activity of mTORC1(p-S6K1-T389 decrease), and induce the activity of mTORC2(p-Akt-S473 decrease). mTORC2-Akt(S474) phosphorylates BAD at S136, may occur in membrane

raft. The phosphorylation of BAD(S136) may regulate WAVE-1 (the component of BAD complex), and make mitochondria move to plasma membrane in order to acquire nutrient. Sequentially, cAMP-PKA signaling phosphorylates BAD(S155).




The results suggest that BAD phosphorylation states correspond to mitochondrial anaplerosis activity, and mitochondrial anaplerosis activity may be coordinated by BAD complex through the cAMP/PKA signaling; furthermore affect mTORC1 and mTORC2 activity to regulate metabolism and cell growth.

Key words: mitochondria; BAD; BAD complex; VDAC; Akt; cAMP-PKA signaling; anaplerosis; AOA; BPTES; KH7

目 錄



致謝.....	i
中文摘要.....	ii
英文摘要.....	iii
圖目錄.....	vii
Chapter 1 引言	1
1.1 BAD complex 參與粒線體相關的代謝作用.....	3
1.2 粒線體在細胞生長時的角色轉變.....	4
1.3 糖解作用成為細胞生長時的主要能量來源: Warburg effect.....	5
1.4 粒線體 TCA cycle 轉為生合成角色.....	6
1.5 細胞生長的中心調節者: mTOR complexes.....	7
1.6 粒線體代謝影響 mTOR complexes 的活性.....	9
1.7 cAMP-PKA signaling 可能是粒線體的代謝訊息.....	10
Chapter 2 實驗目的	11
Chapter 3 材料與方法	12
3.1 材料.....	12
3.2 細胞培養.....	12
3.3 細胞繼代.....	12
3.4 細胞內含物萃取.....	12
3.5 蛋白質濃度測定與樣本製備.....	13
3.6 西方墨點法.....	13



Chapter 4	結果	14
4.1	AOA 抑制粒線體 anaplerosis 使得 p-BAD(Ser112)下降 p-BAD(Ser136)上升、p-BAD (Ser155) 下降	14
4.2	BPTES 抑制粒線體 anaplerosis 使得 p-BAD(Ser112)上升、p-BAD(Ser136)上升、p-BAD (Ser155) 下降	15
4.3	α -ketoglutarate 可以回復 AOA 對 mTORCs 與 BAD Ser136 磷酸化的影響	15
4.4	Pyruvate 可以回復 AOA 對 mTORCs 與 BAD (Ser112, Ser136) 磷酸化的影響	16
4.5	抑制 soluble adenylyl cyclase 影響 mTORCs 活性和 BAD 磷酸化狀態	16
4.6	抑制 PKA 使得 mTORCs 的活性皆上升和 BAD 磷酸化狀態的改變	17
Chapter 5	討論	18
5.1	粒線體代謝活性 (anaplerosis/cataplerosis) 對調控細胞生長的重要性	18
5.2	mTORC2-akt (Ser473) 活性上升的細胞學意義	18
5.3	p-BAD (Ser136), p-BAD (Ser155) 的細胞學意義	19
Reference		29

圖目錄



Figure 1. U2OS cells 處理 3 mM 的 AOA 12 小時.....	21
Figure 2. U2OS cells 分別處理 5 μ M, 25 μ M 的 BPTES 6 小時.....	22
Figure 3. U2OS cells 共同處理 3 mM AOA 與 5 mM α -KG 12 小時.....	23
Figure 4. U2OS cells 共同處理 3 mM AOA 與 3 mM Pyruvate 12 小時.....	24
Figure 5. U2OS cells 分別處理 5 μ M, 40 μ M KH7 和 10 μ M H89 , 6 小時.....	25
Appendix 1. 本論文所提出 Model 之示意圖.....	26

Chapter 1 引言

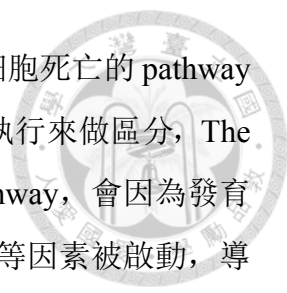


Bcl-2 family proteins 負責細胞 apoptosis 的調控，就像是細胞的殺手，掌握了細胞的生死。成員可能擁有 pro-apoptotic 活性或是 anti-apoptotic 活性。因為它們對調控 apoptosis 的重要性，過去的研究都著重於調控計劃性細胞死亡（programmed cell death）的功能上。

BCL-2（B-cell lymphoma-2）基因是在 B 細胞濾泡淋巴瘤（B-cell follicular lymphomas）中的 t(14;18)染色體轉位斷裂處被發現，在這個位置 BCL-2 的轉錄會因為 immunoglobulin heavy chain gene promoter 和 chromosome 14 上的 enhancer 驅動而過度表現¹。特別的是，BCL-2 overexpression 並不像其他 oncogenes overexpression 一樣會促進細胞增生，而是會抑制細胞死亡²。Apoptosis 被普遍認為是一種抑制癌症的機制。特定的 oncogene 突變，例如 MYC，會導致細胞增生的活化^{3,4}，但是這個作用會被 apoptosis 所以抑制，所以需要第二個突變才能有效的讓腫瘤形成。因此若是將 MYC 和 BCL-2 兩者皆 overexpression，就會在淋巴瘤或是其他癌症的發展上產生有力的協同作用⁵。因此了解到 BCL-2 和其他 BCL-2 family 成員是 apoptosis 程序所必須的，包含發育時的計劃性細胞死亡、組織轉化、抵抗病原等等。

在哺乳類細胞中，至少有 12 種核心的 Bcl-2 family proteins，包含 Bcl-2 自己本身和其他三維結構或是二級結構類似於 Bcl-2 的蛋白質，這些蛋白表現出從抑制到促進 apoptosis 不同的活性。所有的 Bcl-2 family 成員都擁有至少一種的 Bcl-2 homology domains（BH domains）⁶。BH domain 分為 4 種：BH1，BH2，BH3 和 BH4。大部分的 anti-apoptosis 成員至少包含 BH1，BH2 domain，而與 Bcl-2 最相像的成員則包含全部四種 BH domains；pro-apoptosis 成員則分為兩類，根據與 Bcl-2 的相似性做區分，與 Bcl-2 比較相似的像是 BAX 和 BAK，包含 BH1, BH2, BH3 domains。相較之下與 Bcl-2 不相似的成員只包含有 BH3 domain，被稱為 BH3-only proteins⁷，例如 BAD，BID，BIM，NOXA，等，BH3-only proteins 對細胞來說是有力的殺手，被認為是開啟 apoptosis 程序的起始者，BH3 domain 也被稱為 minimal death domain，為 pro-apoptotic 功能所必要的位置。

在 anti-apoptotic 與 pro-apoptotic 成員間，會藉由 heterodimerize 來中和彼此的



效果⁸；所有的 apoptosis pathway 最終都會造成 caspase 的活化，細胞死亡的 pathway 分為兩種，以需不需要 Bcl-2 family protein 與由哪一種 caspase 執行來做區分，The intrinsic pathway 又被稱為 Bcl-2 regulated 或是 mitochondrial pathway，會因為發育的訊號或是病毒感染，DNA damage，或是缺乏 growth factor 等等因素被啟動，導致 caspase-9 的活化⁹。The extrinsic pathway 或稱為 death receptor pathway，會被 death receptors 像是 Fas 或是 TNF receptor-1 (TNFR1) 所啟動，death receptor 包含 death domain 會經由在細胞表面的 adaptor protein Fas-associated death domain (FADD) recruit 和活化 caspase-8。這個作用造成下游 caspases 逐步的活化，像是 caspase-3, -6, or -7，過程中並不需要任何 Bcl-2 family 的參與¹。

Bcl-2 regulated apoptosis pathway 會誘發粒線體外膜 VDAC 的通透性增加，接著 apoptogenic factors 像是 cytochrome c 和 BIABLO 會被釋放到 cytosol 中，導致 caspase 的活化。BAX 和 BAK 被認為是主要負責誘發粒線體外膜 VDAC 通透性的 Bcl-2 family protein，Bcl-2 和 Bcl-xL 會抑制 BAX 和 BAK，而 BH3-only proteins 可能會藉由直接結合和抑制 Bcl-2 或其他 anti-apoptotic family 成員，使得 BAX 和 BAK 被活化¹⁰。

近年來 Bcl-2 family proteins 有別於 apoptosis 的其他功能逐漸被揭露，被稱為 Day Jobs (相對於調控 apoptosis 的 night killers 功能)，例如對細胞代謝、粒線體型態、鈣離子恆定性、葡萄糖感知、autophagy 等等的影響¹¹。以粒線體型態為例，在線蟲的研究中告訴我們，Bcl-2 family proteins 會調控粒線體的 fission 和 fusion。根據分子生物學與生化證據建立了線蟲的 Bcl-2 related protein, CED-9 和 BH-3 only protein, EGL-1¹²。EGL-1 會結合並抑制 CED-9，使 CED-9 無法結合抑制 CED-4，CED-4 就會活化線蟲的 caspase, CED-3^{13,14}，藉此調控 caspase-dependent cell death。CED-9 會調控健康細胞中的粒線體型態，因為 CED-9 會與 dynamin-like GTPase 交互作用，而 dynamin-like GTPase 則會調控粒線體 fusion (FZO-1/MFN1-2) 和 fission (DRP-1)¹⁵⁻¹⁷。在哺乳類細胞也有類似的發現，Bcl-xL 會跟 Drp1 交互作用增加神經細胞中粒線體 fission 和 fusion 的速率¹⁸。BAX 會刺激 MFN2-dependent mitochondrial fusion¹⁹。

1.1 BAD complex 參與粒線體相關的代謝作用

BAD 也是 Bcl-2 family 的一員，屬於 BH-3 only 的 pro-apoptotic protein，會與粒線體外膜上的 Bcl-2, Bcl-xL 結合，抑制其 anti-apoptotic 效果。BAD 的活性取決於 Ser112, Ser136, Ser155 三個位置的磷酸化，當這些位置被磷酸化時，BAD 會與 14-3-3 proteins 結合帶到細胞質中，阻止它與粒線體膜上的 Bcl-2, Bcl-xL 的交互作用²⁰⁻²⁵。Ser112 會被 PKA, Raf, ERK, p90Rsk 磷酸化^{21,26-28}，Ser136 會被 Akt 與 S6K1 磷酸化²⁹⁻³³，Ser155 會被 PKA 磷酸化²²。值得注意的是，Ser112 和 Ser155 皆會被 PKA 磷酸化，而 Ser136 的磷酸化相對獨立。Ser136 的磷酸化使其跟 14-3-3 proteins 的結合，會讓 BAD 產生 conformation change，使得 Ser155 更容易被磷酸化²¹。Ser112 與 Ser136 位於 BAD 與 14-3-3 proteins 的 binding site^{34,35}，而 Ser155 位於與 Bcl-2, Bcl-xL 結合的 BAD BH3 domain 上，Ser155 磷酸化所帶的負電荷會讓使得 BAD BH3 domain 與 Bcl-2, Bcl-xL hydrophobic groove 的交互作用降低，是 BAD 離開 Bcl-2, Bcl-xL 的關鍵步驟³⁶⁻³⁹。

在 2003 年 Danial 等發表於 nature 的報告中指出，BAD 會參與跟粒線體有關的代謝作用，在肝細胞的粒線體外膜上，BAD 會與 PKA, PP1_c, WAVE-1, glucokinase 形成 BAD complex，若是 BAD 缺失，complex 就無法形成，會導致粒線體膜上的 glucokinase 變少，活性下降，連帶的造成細胞耗氧量的減少與 ATP 產率下降。BAD knockout mice 也發現血液中的 glucose 無法被移除，代表 BAD 是 glucose homeostasis 所需要的。BAD 的磷酸化狀態也與調控 glucose homeostasis 有關，若是將 Ser112, Ser136, Ser155 的 Serine 置換成 Alanine (BAD^{3SA})，BAD 無法被磷酸化，粒線體膜上的 glucokinase 活性也會顯著的下降。總結來說，BAD complex 的存在與 BAD 的磷酸化會調控肝細胞 glucokinase 的活性，影響 glucose homeostasis⁴⁰。

另一篇 2008 年發表於 nature medicine 的報告中指出，BAD 的活性會影響 beta cells 由葡萄糖刺激的 insulin 分泌 (glucose-stimulated insulin secretion, GSIS⁴¹)，BAD^{-/-} beta cells 的 GSIS 會顯著的下降，BAD^{-/-} islets 的 glucokinase 活性也顯著降低，代表 BAD 缺失使得 beta cells 無法感知 glucose 的狀態釋放出相對量的 insulin，研究也進一步指出 BAD 對 GSIS 的調控與 BH3 domain 有關，以合成的 BAD BH3 domain peptide 能夠回復在 BAD^{-/-} islets 中反應速率降低的 GSIS，也進一步證實

glucokinase 是 BH3 domain 的 target。BAD 的磷酸化狀態也與調控 GSIS 有關，BAD^{3SA} mutation 會讓 GSIS 降低，而 BAD Ser155 位於 BH3 domain，調控 BAD 與 Bcl-2, Bcl-xL 交互作用，BAD^{S155A} mutation 也會讓 GSIS 降低，而且效果與 BAD^{3SA} mutation 差不多，代表 BAD Ser155 磷酸化是調控 GSIS 的關鍵。以 western blot 分析 fasted mice 分離出的 islets 也發現到 BAD(Ser136, Ser155)磷酸化下降的現象

綜合以上這篇兩篇研究，粒線體上的 BAD complex 與 BAD 的磷酸化狀態會調控粒線體上 glucokinase 的活性和 beta cells 的 GSIS 功能，beta cells 的 insulin 分泌是感知外在營養後所產生的效應，若是對應到其他細胞，反應的現象就是細胞生長，所以 BAD complex 與 BAD 的磷酸化狀態很可能與細胞生長營養的調控有所關連。

1.2 粒線體在細胞生長時的角色轉變

生長是生命最重要的特徵之一，而個體的生長是基於組成細胞數的增加，除了分化後即不再增生的細胞外，大部分的細胞會藉由不斷的細胞分裂增加組織的質量，達到生長的目的。增加細胞數的現象稱為細胞增生 (cell proliferation)，包含兩個部分，分別為細胞生長 (cell growth) 與細胞分裂 (cell division)，細胞生長必須發生在細胞分裂之前，將其內含物增加到兩倍，才能進行細胞分裂，成為兩個形態與功能皆相同的子細胞。生長的過程受到各種不同機制的調控，為了讓染色體的套數、細胞質量 (biomass)、胞器數目、細胞膜等等都要精準的複製成兩倍，維持分裂後細胞的忠實性 (fidelity)，若是在細胞生長的過程中產生變異，導致細胞忠實性無法維持，就可能轉變為癌細胞，形成腫瘤，危害個體的生命安全。

在細胞生長的過程中，必須要不斷的從外界吸收營養，作為將細胞質量擴增成兩倍大的建材，在被利用之前，這些由外界吸收的營養物質必須經由代謝轉換的過程，轉變為細胞生合成所需的前驅物，而這些營養進行代謝轉換的地點，就位在粒線體之中。

生長細胞和已分化不再增生的細胞在代謝上有著極大的差異，不再增生的細胞只需要維持基本的生理功能，依賴粒線體的氧化磷酸化作用來產生細胞所需的能量。葡萄糖經由糖解作用 (glycolysis) 和粒線體三羧酸循環 (TCA cycle) 被完全氧化成 CO₂，產生的 NADH 作用電子傳遞鏈造成粒線體內膜兩側的氫離子濃度

梯度，推動 F_0-F_1 ATPase 合成 ATP 供細胞使用，也就是說能量主要由粒線體這個“能量工廠”提供；進行生長的細胞則傾向以糖解作用作為主要的能量來源，稱為 Warburg effect⁴²，因為除了能量需求，生長的細胞還需要有效率的將獲取的營養轉變為巨分子生合成前驅物，來累積 Biomass（核酸、胺基酸、脂質等），這時候粒線體的角色就由“能量工廠”轉變為“生合成前驅物轉運中心”，這樣的改變稱為代謝重整（Metabolic reprogramming）⁴³。

1.3 糖解作用成為細胞生長時的主要能量來源：

Warburg effect

Warburg effect 是在 1956 年由 Otto Warburg 所提出，他發現快速增生的癌細胞消耗葡萄糖的速率比正常細胞快很多，並在有氧的情況下將葡萄糖代謝為乳酸來產生 ATP，而非經由氧化磷酸化作用將葡萄糖完全氧化成 CO_2 ⁴⁴。原本 Warburg 認為是因為癌細胞氧化代謝的能力損壞使得癌細胞傾向以糖解作用產生能量，但是之後的研究發現，許多高度增生的癌細胞其氧化代謝的能力並沒有損壞，且在一般持續增生的細胞中也發現 Warburg effect 的現象⁴⁵，也就是說 Warburg effect 並非細胞因為氧化代謝能力損壞所產生的替代方案，那究竟進行 Warburg effect 對這些以增生為目的細胞有什麼好處？首先，它使得細胞利用葡萄糖的效率提高，雖然表面上看起來糖解作用產生的 2 個 ATP 比氧化磷酸化作用最高產生的 36 個 ATP 少很多，但是當葡萄糖供給充足，糖解作用的速率夠快，產生 ATP 的比例是比氧化磷酸化作用還要更高的⁴⁶。另一項好處是葡萄糖降解會產生可供細胞生合成利用的前驅物，例如 glucose-6-phosphate 經由 Pentose phosphate pathway (PPP) 產生 ribose-5-phosphate，提供細胞合成核酸，還能夠產生 NADPH，有助於脂質和核酸的合成，另一個糖解作用中間產物 3-phosphoglycerate 則能夠作為胺基酸和脂質合成的碳源。所以 Warburg effect 使得細胞在能量和生合成兩方面都更有優勢⁴²。

Warburg effect 還可以避免過多 reactive oxygen species (ROS) 產生，若是以氧化磷酸化作用完全氧化葡萄糖，必須透過電子傳遞鏈產生氫離子濃度梯度，但是電子傳遞鏈的 complex I 和 complex III 容易產生 ROS 再加上細胞生長時由於大量的合成反應，能量需求提高，若使用電子傳遞鏈將產生大量的 ROS 破壞細胞結構，造成生長停止。故透過 Warburg effect 產生能量，也能降低產生 ROS 的問題

47。

在糖解作用快速進行的情況下，產生的 NADH 會負回饋抑制糖解作用的進行⁴⁸，為了避免這個情況發生，細胞提高 lactate dehydrogenase A (LDH-A) 的活性，將 pyruvate 轉換成 lactate，同時重新產生 NAD⁺，維持高比例的 NAD⁺/NADH 使得糖解作用能夠高效率的進行，而乳酸則排出到細胞外⁴⁹。也就是說，只要葡萄糖供給充足，Warburg effect 就能讓糖解作用高效率的提供 ATP 供給細胞生長所需的能量。

1.4 粒線體 TCA cycle 轉為生合成角色

將產生能量的工作交給糖解作用後，粒線體的代謝角色隨之轉變，因為持續增生的細胞需要大量的合成脂質、蛋白質等巨分子，所以粒線體轉變為巨分子合成的轉運中心，持續的將 TCA cycle 的中間產物匯出，作為巨分子合成的前驅物，稱為 cataplerosis。例如合成新的細胞膜需要 fatty acid，這時候 citrate 會從粒線體 TCA cycle 匯出到細胞質，和 CoA 一起經由 ATP citrate lyase 轉換成 acetyl-CoA，再由 fatty acid synthase 合成 fatty acid 或是經由其他途徑合成 cholesterol, isoprenoid。研究也發現持續增生的正常細胞和癌細胞的 ATP citrate lyase 和 fatty acid synthase 表現量都比較高⁵⁰⁻⁵²，顯示細胞為了生長的需求而不斷的合成脂質。許多胺基酸合成的前驅物也是由 TCA cycle 的中間產物進行轉胺作用 (transamination) 提供，Oxaloacetate 被轉胺後產生 aspartate，提供合成 asparagine 的前驅物; α -ketoglutarate 轉胺後產生 glutamate，可以被轉換成 proline, arginine, 和 glutamine。

但持續的匯出中間產物會讓 TCA cycle 變成一個被截斷的反應 (truncated cycle)^{50,53}，為了維持 TCA cycle 的運轉，必須補充中間產物，稱作 anaplerosis。glutamine 被認為是 anaplerosis 主要用來補充的營養，換句話說大部分細胞進行的是 glutamine-dependent anaplerosis^{54,55}。glutamine 是血液中含有最多的胺基酸，經由 glutamine transporter 到達粒線體後進行 glutaminolysis, glutaminolysis 包含兩個脫氨反應，首先 glutamine 被 glutaminase (GLS) 轉換成 glutamate 和 NH₃，然後 glutamate 再進一步被 glutamate dehydrogenase (GDH) 轉換成 α -ketoglutarate，匯入 TCA cycle 補充。癌細胞和持續增生的細胞都需要高量的 glutamine 供給^{56,57}，來維持 anaplerosis/cataplerosis 持續且穩定的進行，以應付生長所需的大量巨分子

合成⁵⁸⁻⁶²。Warburg effect 與粒線體轉換成生合成角色 (anaplerosis/cataplerosis) 這兩項代謝上的改變，是細胞為了因應生長的需求所進行的代謝重整 (metabolic reprogramming)，使細胞在能量與生合成兩方面都調整到最適合生長的狀態，也突顯粒線體 anaplerosis/cataplerosis 對細胞生長有關鍵性的影響。



1.5 細胞生長的中心調節者: mTOR complexes

Mammalian target of Rapamycin (mTOR) 是細胞生長最重要的中心調節者，調控細胞生長許多重要的路徑。mTOR 會形成兩種不同的複合體，分別為 mTOR complex 1 (mTORC1) 與 mTOR complex 2 (mTORC2)。mTORC1 的組成包含 mTOR, mLst8, Raptor, PRAS40 及 Deptor 等，活性會被 rapamycin 抑制，參與的調控包含活化 mRNA translation 與抑制 autophagy 等，利於細胞有效率的累積 biomass; mTORC2 的組成則包含 mTOR, mLST8, Rictor, mSin1, Protor 等，對 rapamycin 抑制不敏感，可能經由 Rho family proteins 調控細胞骨架進行細胞體積的擴展，但其活化的機制尚未完全明瞭。

mTORC1 的活性整合了各種反應外界環境的信息，這些信息包含 growth factors, nutrients, energy 等的可得性，借此判斷環境是否利於生長。mTORC1 的直接活化者為 small GTPase Rheb, Rheb 與 GTP 結合時會活化 mTORC1，而 FKBP38 則會與 Rheb-GTP 競爭 mTORC1 的結合位，為 mTORC1 的 endogenous inhibitor。Rheb-GTP 上游的 TSC1/2 擁有 GTPase-activating protein (GAP) 活性，會讓 Rheb-GTP 轉換成 Rheb-GDP 而無法活化 mTORC1，抑制 mTORC1 的活性。

Growth factors 活化 mTORC1 途徑是經由 PI3K 活化 Akt (Thr308)，被活化的 Akt 磷酸化 TSC2，抑制 TSC1/2 對 Rheb 的抑制作用，使得 Rheb-GTP 活化 mTORC1。Growth factor 對 mTORC1 的調節會被 mTORC1-S6K1 負迴饋控制⁶³⁻⁶⁵。

Nutrients (特別是胺基酸) 對 mTORC1 的活化途徑，有研究指出是經由 Rag family of GTPase (Rag A/B 和 Rag C/D) 與 Ragulator 形成 complex 聚集在 lysosome 的表面，胺基酸會誘發 mTORC1 和 Rheb 到 Ragulator-Rag complex 的位置，使得 mTORC1 被 Rheb 活化⁶⁶⁻⁷³。但是 lysosome 的 amino acid 狀態並不能完全代表外界細胞能夠利用的胺基酸狀態，所以可能還有其他胺基酸訊息能影響 mTORC1 活性，稍後會繼續討論。當 mTORC1 具備活性，就會磷酸化下游的 S6K1 與 4E-BP 於轉



譯層級促進蛋白質的合成。

S6K1 屬於 AGC protein kinase family, AGC protein kinase family 的活性需要 catalytic activation loop 和 hydrophobic motif 兩者的磷酸化活化, S6K1 的 catalytic activation loop (Thr229) 由 PDK1 磷酸化, 而 hydrophobic motif (Thr389) 會被 mTORC1 磷酸化, 被活化的 S6K1 會對 40S ribosomal protein S6 磷酸化進而促進 5'TOP (5' end oligopyrimidine tract) mRNAs 的轉譯, 這其中包含很多轉譯所需要的元件, 於是又更進一步促進其他蛋白質的合成, 形成一個細胞生長的正回饋⁷⁴, 不過有研究指出, 雖然 mTOR 是調控 5' TOP mRNAs 轉譯的關鍵, 但是 S6K1 和 S6 似乎並不是必要的, 所以 mTORC1 如何促進這些 mRNA 的轉譯仍然有待研究⁷⁵。

mTORC1 對 4E-BP1 磷酸化會使得 4E-BP1 無法結合 cap-binding protein eIF4E, 使 eIF4E 能夠參與 eIF4F complex 的形成, 促進 cap-dependent translation initiation⁷⁶。其中包含一些調控粒線體生成與細胞生長的重要調節者, 例如 Hif1- α , c-myc, 和 cyclinD, 他們都參與代謝重整, 執行與細胞生長相關的重要功能。由此可知 mTORC1 藉由調控蛋白質的轉譯來控制細胞的生長, 處理 mTORC1 的 inhibitor 會使得細胞整體蛋白質合成速率顯著下降, 使得細胞生長停滯。

跟 mTORC1 比起來, 我們對 mTORC2 的所知較少, 目前已知 mTORC2 會被 growth factor (例如 insulin) 活化, 被活化的 mTORC2 會磷酸化下游的 AGC kinase subfamily 成員, 包含 Akt, SGK1, 和 PKC- α 。SGK1 的功能為調控離子運輸並影響生長⁷⁷, 而 PKC- α 會藉由影響 actin cytoskeleton 調控細胞形狀⁷⁸。

Akt 則在細胞的各種調控上都有關鍵性的影響, 例如葡萄糖代謝 (glucose metabolism), 細胞生存 (survival)、生長 (growth)、增生 (proliferation), 細胞凋亡 (apoptosis) 等等⁷⁹, 前一章節已經提到 Growth factor 會經由 PI3K/PDK1 磷酸化 Akt(Thr308), 當 Akt(Thr308) 被磷酸化, mTORC2 會磷酸化 Akt 的 hydrophobic motif (Ser473), 使得 Akt 具備最大的活性。而這兩個磷酸化反應皆發生於靠近細胞膜的位置, 這個細胞學事實值得我們更深入思考其意義。受 Akt 調控的下游分子很多, 例如 GSK3、MDM2、p27、FoxO、BAD 等等, 其中 FoxO 與 BAD 跟細胞的存活有密切的關聯, Akt 對 FoxO 和 BAD (Ser136) 磷酸化, 會讓它們容易與 14-3-3 結合, 抑制其 pro-apoptotic functions^{29,80}。

Akt 與 mTORC1 和 mTORC2 都有交互作用，mTORC2 磷酸化 Akt (Ser473)，位於 Akt 的上游；mTORC1 則是會被有 Thr308 磷酸化的 Akt 活化，雖然研究指出 mTORC1 的活化不需要 Akt 的 Ser473 磷酸化，也就是說不能直接連結 mTORC2-Akt-mTORC1 這樣的上下游關係，但是 Akt 仍為探討 mTORC1 與 mTORC2 之間關連性的重點之一。

1.6 粒線體代謝影響 mTOR complexes 的活性

綜合以上敘述我們了解到 mTORC1 和 mTORC2 在細胞生長扮演中心調節的角色，並且 mTORC1 的活性會反應胺基酸可得性，調控細胞的生長，另一方面我們也知道細胞生長時，合成 Biomass 所需的前驅物大部分由粒線體 anaplerosis/cataplerosis 所提供，而且 anaplerosis 的效率就代表生長中細胞獲取營養的效率，所以可能有某種訊息因為粒線體 anaplerosis/cataplerosis 而產生，然後傳遞到 mTORC1，使得 mTORC1 被活化。這與現今主流的 mTORC1 胺基酸活化路徑的報告有所出入，大部分的報告認為胺基酸感知是經由 lysosome 將訊號傳給 mTORC1。但這可能是細胞在 starvation 時所發生的效應。當細胞處於 starvation 的狀態，會進行 autophagy 分解部分胞器以維持細胞正常的生理與存活，此時細胞依賴的營養感知可能是 lysosome，但是當細胞生長時，為了有效累積 biomass，需要的是由外界獲取至細胞內的營養，因為要讓細胞各部分都擴增成兩倍並非利用細胞內固有物質的轉換就能夠達成的，所以 autophagy-lysosome 這條胺基酸感知途徑，並無法使生長中的細胞累積 biomass。因此對處於正常營養狀態的生長中細胞而言，粒線體是比 lysosome 更好的整合者，透過其代謝活性整合了胺基酸的可得性，再轉換成某種訊號傳遞給 mTORC1，使得 mTORC1 能夠持續具有活性，並有效率的執行細胞 Biomass 的累積。被活化的 mTORC1 會正回饋刺激粒線體的生合成，也會促使更多的 nutrient transporters 到細胞膜上攝取外來營養。此外粒線體也聯繫了生長細胞中負責能量供給的 glycolysis，形成一個更全面的整合網絡。這些現象都說明 mTOR complexes 與粒線體的交互作用在細胞生長的過程中執行著關鍵性的調控。

1.7 cAMP-PKA signaling 可能是粒線體的代謝訊息

在哺乳類細胞中，第二傳訊者 cyclic AMP (cAMP) 會活化 cAMP-dependent protein kinase (PKA) 來調控許多細胞的機制，例如離子運輸、蛋白質的磷酸化作用等等，在粒線體內也發現有 cAMP 與 PKA 的存在。cAMP 主要由兩種不同的 adenylyl cyclases 所產生，分別是 transmembrane adenylyl cyclase (tmAC) 和 soluble adenylyl cyclase (sAC)，而一般認為在粒線體中作用的是 sAC，sAC 會被 bicarbonate 刺激而且對 ATP 和 Ca^{2+} 的濃度敏感。粒線體 TCA cycle 進行時，在 isocitrate 被 isocitrate dehydrogenase 轉換成 α -ketoglutarate，與 α -ketoglutarate 被 α -ketoglutarate dehydrogenase 轉換成 succinyl-CoA 這兩個步驟會釋放出 CO_2 ，carbonic anhydrases (CA) 會將 CO_2 轉換成 bicarbonate，刺激 sAC 產生 cAMP，進而活化 PKA，形成 $\text{CO}_2\text{-HCO}_3^-$ -sAC-cAMP-PKA 的 signaling cascade⁸¹。在生長的細胞中，TCA cycle 的進行由 glutamine-dependent anaplerosis 不斷的補充 intermediate 所驅動，換言之粒線體內的 cAMP-PKA signaling 反應的是胺基酸的可得性。因此粒線體可能是藉由 cAMP-PKA signaling 來影響 mTOR complexes。

PKA 會與 A-kinase anchor protein (AKAP) 交互作用，使其具備時間和空間上的特異性，AKAP 具有 scaffold protein 的功能，會集合 protein kinase, phosphatases, adaptor molecules, AC, phosphodiesterases (PDE), mRNAs 等形成 AKAP complex，然後聚集在膜系統或胞器（包含粒線體）上⁸²，PDE 會讓由 AC 產生的 cAMP 分解成 AMP，因此 PDE 的分佈能夠將 cAMP-PKA signaling 限制在特定位置，產生空間上的特異性，而 phosphatases 則會在特定訊息的刺激下將 PKA 或其他 protein kinase 所做的磷酸化去除，終止反應，形成時間上的特異性。粒線體上的 AKAP 有 AKAP121、Rab32、WAVE-1 等，其中 WAVE-1 與粒線體的分佈有關，在神經細胞的研究中發現，WAVE-1 的功能會被其磷酸化狀態所調控，會促進與 Arp2/3 有關的 actin polymerization，使粒線體移動到特定的區域⁸³。WAVE-1 和 PKA 皆為 BAD complex 的成員，所以我們認為在粒線體內因 anaplerosis 產生的 cAMP-PKA signaling 有可能在 BAD complex 做整合，進而影響 BAD 的活性。

Chapter 2 實驗目的



根據本實驗室先前的研究指出，當我們對人類肺纖維母細胞（WI38 cells）處理 anaplerosis 的抑制劑 aminooxyacetic acid(AOA)，會觀察到 mTORC1 活性下降，mTORC2 活性上升的現象，也就是說粒線體 anaplerosis 會影響 mTORC1 和 mTORC2 的活性，cAMP-PKA signaling 可能參與其中，機制可能是：胺基酸進入粒線體代謝(anaplerosis/cataplerosis)後產生的 CO₂ 被轉換成 bicarbonate 活化 sAC 促進 cAMP-PKA signaling，再進一步對 mTORCs signaling 使得影響。

粒線體膜上存在 BAD complex，成員包含 BAD, PKA, PP1c, WAVE-1, glucokinase。PKA 的存在可能代表粒線體內的 cAMP-PKA signaling 會在 BAD complex 做整合。BAD 是 BAD complex 的核心，沒有 BAD，BAD complex 就不會形成，研究指出 BAD 的磷酸化狀態調控許多與粒線體相關的代謝作用，所以粒線體的代謝狀態可能反應在 BAD 的磷酸化狀態上。WAVE-1 會藉由調控 actin polymerization 改變粒線體的分佈，可能幫助粒線體到 nutrient transporter 附近接收胺基酸。

綜合以上可能性，歸納出本研究著重的實驗目的：

1. 探討 BAD 的磷酸化狀態是否反應粒線體 anaplerosis/cataplerosis
2. cAMP-PKA signaling 是否參與粒線體 anaplerosis/cataplerosis 對 BAD 磷酸化活性的影響，進而調控 mTORCs 的活性。

Chapter 3 材料與方法



3.1 材料

Anaplerosis inhibitor, AOA, 購自 Sigma-Aldrich, Stock 濃度為 500mM

Glutaminolysis inhibitor, BPTES, 購自 Sigma-Aldrich

Pyruvate, 購自 Sigma-Aldrich

α -ketoglutarate, 購自 Sigma-Aldrich

Soluble adenylyl cyclase inhibitor, KH7, 購自 Sigma-Aldrich

Protein kinase A inhibitor, H89, 購自 Sigma-Aldrich

3.2 細胞培養

細胞未使用時冷凍保存於液態氮中，解凍時，將冷凍小管置於 37°C 水浴槽中，待冰接近全融，將含有細胞的培養基轉移至內有 37°C growth medium 的 flask 中，輕搖 flask 使細胞分散均勻，接著置於恆溫 37°C，5% CO₂ 的培養箱中培養，隔一天後更換 growth medium，之後每兩天更換新鮮的 growth medium。

3.3 細胞繼代

當細胞密度達到 80% ~ 90%，必須稀釋細胞密度，以保證細胞生長空間。此時將所有培養基移除，加入 PBS 稍作清洗，接著加入 1 mL trypsin-EDTA，置於培養箱中作用 2~3 分鐘，輕拍 flask，待細胞自底部脫落後，加入適量 growth medium 終止 trypsin 作用，接著反覆 pipetting 將細胞打散均勻，取適當比例的細胞回種至 flask 中，補足 7 mL 的 growth medium，放回培養箱繼續培養。

3.4 細胞內含物萃取

當加藥處理到指定的時間後，將細胞拿出培養箱，移除 dish 內的 growth medium，以冰 PBS 潤洗兩次，加入 1 mL PBS 後將細胞刮下，接著以 1020 x g 離心 5 分鐘收集細胞，移除 PBS 後加入與細胞體積等量的 lysis Buffer (50 mM Tris-HCl, 1% NP-40, 2.5% Sodium Deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM NaF, 1 mM

Na₃VO₄, protease inhibitor)置於冰上 30 min 反應，且每隔 15 min 震盪細胞，再以 12900 x g 離心 20 min，離心完的上清液即包含萃取出來的細胞蛋白質，若沒有要立刻配成 sample，可以將上清液移至-80°C 冰箱保存。



3.5 蛋白質濃度測定與樣本製備

蛋白質濃度使用 Bradford protein assay (購自 Bio-Rad) 分析，將樣本配置成等量的蛋白質量，接著加入 Laemmli Sample Buffer，煮沸 10 分鐘，若未立刻使用冷卻後放入-20°C 冰箱保存。

3.6 西方墨點法

利用 SDS-PAGE 分離蛋白質，膠的濃度根據欲分析的蛋白質分子量而定，本實驗使用的膠濃度為 5%~15% 的 gradient gel，將等體積的樣本和 Marker 注入 SDS-PAGE 膠上方的槽中，以 15~20 mA 的電流驅動蛋白質分離，完全分離時間約 1~2 小時，接著將蛋白質轉漬到 0.22 μm PVDF membrane 上，PVDF 使用前要浸泡 methanol 活化，將 gel、membrane、filter paper、海綿和夾子配置好了以後，放入 Bio-rad tank，加入 transfer buffer 進行轉漬。電流為固定 220 mA、時間 2 小時。轉漬完成後以 5% 的牛奶或 BSA 室溫 Blocking 1 小時。接著下一抗，滾一抗的時間根據抗體效率而定，本實驗一抗條件為，一抗和二抗之間需以 TBST 清洗 membrane，共 3 次每次 10 分鐘，二抗以一抗種類來決定是使用 anti-rabbit 或 anti-mouse，條件為 4°C overnight 一天，二抗下完後，再以同樣條件清洗 membrane，接著加入 ECL substrate 進行冷光呈色，以螢冷光影像分析系統偵測訊號，判別特定蛋白質的相對量。

一抗稀釋倍率：p-S6K1-Thr389(1:1000)、p-Akt-Ser473(1:1000)、p-BAD-Ser112(1:500)、p-BAD-Ser136(1:1000)、p-BAD-Ser155(1:500) 以上配製於 3% BSA 中，actin(1:10000) 配製於 5% 的牛奶中。

二抗稀釋倍率：anti-rabbit(1:20000)、anti-mouse(1:10000) 配置於 5% 牛奶中。

Chapter 4 結果



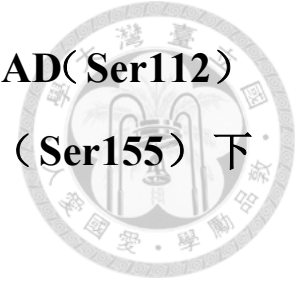
4.1 AOA 抑制粒線體 anaplerosis 使得 p-BAD (Ser112) 下降, p-BAD (Ser136) 上升、p-BAD (Ser155) 下降

為了探討 BAD 磷酸化與粒線體 anaplerosis 的關聯性，我們使用粒線體 anaplerosis 的抑制劑 AOA。AOA 會進入粒線體中抑制 GDH 的活性，使得 glutamate 無法被轉換成 α -ketoglutarate 進入 TCA cycle 中進行補充，阻斷粒線體 anaplerosis。對人類骨肉瘤細胞 (U2OS cells) 處理 3mM AOA 12 小時後，與控制組比較，結果顯示 p-S6K1 (Thr389) 下降與 p-Akt (Ser473) 上升 (**Fig. 1a**)，分別代表 mTORC1 活性的下降與 mTORC2 活性的上升，與先前對 WI38 cells 處理 AOA 的實驗結果相符，WI38 cells 屬於持續增生的正常細胞，會進行代謝重整，證明在經過代謝重整的正常細胞和癌細胞中，粒線體 anaplerosis 都會對 mTORC1 與 mTORC2 的活性使得影響，anaplerosis 與 cataplerosis 是連動的反應，抑制 anaplerosis 就等於抑制 anaplerosis/cataplerosis 整體，粒線體失去整合營養可得性進而提供細胞巨分子合成前驅物的功能，所以使得能感知營養狀態調控生長的 mTORC1 活性下降，而 mTORC2 的上升可能是因為 mTORC1-S6K1 對 IRS-1 的 negative feedback 作用消失，讓會被 growth factor 活化的 mTORC2 活性上升。

AOA 抑制 anaplerosis 也使得 BAD 的磷酸化狀態改變，其中 p-BAD (S136) 上升 (**Fig.1a**)，BAD (S136) 會被 Akt 或 S6K1 磷酸化，在 AOA 處理的情況下，p-S6K1 的活性下降，p-Akt 的活性上升，也就是說 BAD(S136) 磷酸化上升是 p-Akt 的作用，考慮細胞學事實，Akt 的活化位於膜上，所以 BAD (S136) 被 Akt 磷酸化的作用可能也在細胞膜的附近發生，稍後會繼續詳細討論。

p-BAD(S112, S155) 會因為 AOA 抑制 anaplerosis 而下降 (**Fig.1b**)，BAD(S112) 會被 PKA, Raf, ERK, p90RSK 磷酸化，BAD (S155) 會被 PKA 磷酸化，PKA 是兩個磷酸化位置共有的激酶，p-BAD (S155) 下降代表 PKA 的活性降低，這個結果增加 cAMP-PKA signaling 反應粒線體 anaplerosis/cataplerosis 然後由 BAD complex 整合 cAMP-PKA signaling 的可能性。

4.2 BPTES 抑制粒線體 anaplerosis 使得 p-BAD(Ser112) 上升、p-BAD (Ser136) 上升、p-BAD (Ser155) 下降



為了更加確定 BAD 磷酸化與粒線體 anaplerosis 的關聯性，我們使用另一種 anaplerosis 的抑制劑，BPTES。BPTES 比 AOA 更加專一，抑制的 target 也與 AOA 不同，BPTES 會進入粒線體中專一性抑制 glutaminase，使得 glutamine 進入粒線體後無法被轉換成 glutamate，也就是抑制 glutaminolysis 的第一個脫氨反應，第一步反應被阻斷的使得後續的步驟無法進行，glutamine 無法經由 glutaminolysis 轉換成 α -ketoglutarate 補充粒線體 TCA cycle intermediate 所以使得 anaplerosis 受到抑制。

對 U2OS cells 分別處理 5 μ M、25 μ M 的 BPTES 6 小時的實驗結果發現 mTORC1 活性的下降，mTORC2 活性的上升 (**Fig.2a**)，而且影響程度根據處理 BPTES 的濃度增加而增加，25 μ M 比 5 μ M 更有效果。這與 AOA 處理的得到的實驗結果相同，更進一步的證明粒線體 anaplerosis 會影響 mTORCs 的活性。

處理 BPTES 對 p-BAD (Ser136)、p-BAD (Ser155) 的影響也與 AOA 處理相同，p-BAD (Ser136) 因為 p-Akt (Ser473) 活性上升而上升，而 p-BAD (Ser155) 可能因為 BPTES 抑制 anaplerosis 使得 cAMP-PKA signaling 下降而下降 (**Fig. 2ab**)。處理 BPTES 會讓 p-BAD (Ser112) 上升 (**Fig. 2b**)，與 AOA 處理結果不同，因為會磷酸化 BAD (Ser112) 的分子很多，包含 PKA, p90RSK, ERK, Raf。BPTES 處理是透過哪些分子增加 BAD (Ser112) 磷酸化有待日後實驗證明。

4.3 α -ketoglutarate 可以回復 AOA 對 mTORCs 與 BAD Ser136 磷酸化的影響

以上實驗證明 AOA 抑制粒線體 anaplerosis 影響 mTORCs 活性與 BAD 的磷酸化狀態，接著我們以 α -ketoglutarate 與 AOA 共同處理， α -ketoglutarate 能跳過 AOA 的抑制作用直接匯入粒線體 TCA cycle 補充 intermediate，使得 TCA cycle 能夠正常的運作，觀察是否能夠回復 AOA 對 mTORCs 與 BAD 磷酸化狀態造成的影響。

結果指出，以 5 mM α -ketoglutarate 和 3 mM AOA 共同處理 U2OS cells 12 小時後，與單獨處理 3 mM AOA 的組別比較，p-S6K1 (T389) 和 p-Akt (Ser473) 的

量皆回復到跟控制組相近的量 (**Fig. 3a**)，也就是說 α -ketoglutarate 能夠回復 AOA 對 mTORCs 的影響。

AOA 對 p-BAD (Ser136) 的影響也同樣會被 α -ketoglutarate 回復 (**Fig. 3a**)，但是 α -ketoglutarate 無法回復 AOA 所使得 p-BAD (Ser155) 下降 (**Fig. 3b**)，同時處理 α -ketoglutarate 與 AOA，p-BAD (Ser155) 的量跟單獨處理 AOA 差不多。

4.4 Pyruvate 可以回復 AOA 對 mTORCs 與 BAD(Ser112, Ser136) 磷酸化的影響

除了 α -ketoglutarate 以外，我們也以 Pyruvate 來回復 AOA 對 anaplerosis 的抑制，Pyruvate 是 Glycolysis 的產物，會在粒線體內被 pyruvate dehydrogenase (PDH) 轉換成 acetyl-CoA 進入 TCA cycle，也會被 pyruvate carboxylase 轉換成 OAA 同樣進入 TCA cycle 補充。

以 3 mM pyruvate 與 3 mM AOA 共同處理 U2OS cells 12 小時的結果顯示，mTORCs 的活性與 BAD(Ser112, Ser136) 的磷酸化狀態都可以被回復 (**Fig. 4ab**)，唯獨 BAD (Ser155) 的磷酸化無法被回復 (**Fig. 4b**)，與 α -ketoglutarate 的效果相同。

4.5 抑制 soluble adenylyl cyclase 影響 mTORCs 活性和 BAD 磷酸化狀態

接下來我們想要探討 cAMP-PKA signaling 是否參與粒線體 anaplerosis 與 mTORCs 活性之間的調控，粒線體內的 cAMP-PKA signaling 的活化主要受 sAC 調節，所以我們處理 sAC inhibitor, KH7，觀察是否有與抑制 anaplerosis 類似的效果。

對 U2OS 處理 KH7 6 小時後，實驗結果顯示 mTORC1 活性下降，mTORC2 活性上升 (**Fig.5**)，跟以 AOA, BPTES 抑制粒線體 anaplerosis 的效果相同。

而在 BAD 的磷酸化狀態方面，則觀察到 p-BAD(Ser112)下降，p-BAD(Ser136)上升，p-BAD (Ser155) 下降 (**Fig.5**)，與 AOA 處理效果相同。

4.6 抑制 PKA 使得 mTORCs 的活性皆上升和 BAD 磷酸化狀態的改變

接著我們使用 PKA inhibitor, H89。因為 sAC 和 tmAC 都會將 ATP 轉換成 cAMP 活化 PKA，所以 H89 的抑制跟 KH7 比起來位於更下游，對 U2OS 細胞處理 10 μ M H89 6 小時的結果顯示，mTORC1 與 mTORC2 的活性皆上升 (**Fig. 5a**)，其中對 mTORC1 活性的影響與處理 AOA、BPTES、KH7 的結果不同。因為抑制 PKA 在細胞內造成的影響可能更廣泛（不局限於粒線體內的代謝訊息），所以可能有其他調控使得 mTORC1 活性上升。

而在 BAD 磷酸化狀態方面，抑制 PKA 會使得 p-BAD (Ser112) 下降、p-BAD (Ser136) 上升、p-BAD (Ser155) 下降 (**Fig. 5ab**)，結果與 AOA、KH7 處理相似。增加 BAD 整合 cAMP-PKA signaling 的可能性。

Chapter 5 討論



5.1 粒線體代謝活性（anaplerosis/cataplerosis）對調控細胞生長的重要性

在本篇研究中，分別使用兩種不同的 anaplerosis 抑制劑，AOA 與 BPTES，來反覆證明粒線體 anaplerosis/cataplerosis 對 mTORCs 的影響，在 AOA, BPTES, 的處理下，都會使得 mTORC1 失去活性。粒線體 anaplerosis 反應的是外界營養（特別是胺基酸）的可得性，因為細胞生長時需求量最大的胺基酸 glutamine，就是在粒線體內經由 glutaminolysis 代謝，轉換成 TCA cycle 的 intermediates，然後經由 cataplerosis 匯出到細胞質中提供各種巨分子生合成的前驅物，而當這個對生長中的細胞十分重要的粒線體代謝功能因為 anaplerosis 被抑制而失效，細胞無法獲得為了增加 Biomass 所需的各種巨分子前驅物，對細胞而言就像是處於 starvation 一般，失去了營養的可得性，這樣的結果造成細胞營養感知中心 mTORC1 的失活。mTORC1 失去活性會使得細胞整體的蛋白質合成效率的下降，失去對 autophagy 的抑制效果，細胞週期停滯，最終導致細胞老化甚至 apoptosis。

而在粒線體代謝與 mTORCs 的交互作用之間，我們也提出了可能聯繫兩者的代謝訊號，也就是 cAMP-PKA signaling，因為粒線體內的 cAMP-PKA signaling 是 anaplerosis 所轉換而成的具體訊號，當 anaplerosis 驅動 TCA cycle 使其穩定進行，在 isocitrate 轉換成 α -ketoglutarate，與 α -ketoglutarate 轉換成 succinyl-CoA 這兩個步驟會釋出 CO_2 經由 CA 轉換成 bicarbonate 活化 sAC，sAC 將 ATP 轉換成 cAMP 活化 PKA，然後 PKA 再影響 mTORCs，KH7 處理對 mTORCs 的影響與 anaplerosis 抑制物，AOA、BPTES 類似，增加了 cAMP-PKA signaling 聯繫 anaplerosis 與 mTORCs 的可能性。

5.2 mTORC2-akt (Ser473) 活性上升的細胞學意義


當處理 AOA, BPTES, KH7 時，皆發現有 mTORC2 活性上升的現象，而下游的 Akt (Ser473) 磷酸化程度也上升，Akt 除了 Ser473 以外，還有 Thr308 的位置會被磷酸化，而活化 Akt (Thr308) 的是 PDK1，Akt (Thr308) 反應了由 growth factor

活化的 PI3K signaling pathway，值得注意的是 PDK1 活化 Akt (Thr308) 的位置位於細胞膜上，而 mTORC2 也在 membrane rafts 被發現且 Akt (Ser473) 也包含在其中⁸⁴，也就是說 Akt 的活化在細胞膜發生，而會被 Akt 磷酸化的下游分子可能也要到細胞膜才能被活化。也就是說 mTORC2-Akt signaling 可能會是一種 recruit 特定目標到細胞膜附近的代謝訊號。

我們知道粒線體內的胺基酸代謝對細胞生長非常的重要，粒線體也是胺基酸主要的代謝場所之一，那究竟胺基酸經由 nutrient transporter 進入到細胞後是如何到達粒線體代謝的呢？一般而言，細胞內物質的運輸可能是透過 free diffusion 或是 vesicle trafficking，但是胺基酸不太可能使用這兩種方法到粒線體，首先因為細胞中充滿各式各樣的酵素，若是純粹以 free diffusion 的方式運輸，可能因為缺少保護，在到達粒線體前就被其他反應所代謝。而若要以 vesicle trafficking 運輸的話，必須要有像是 SNAREs 的 vesicular transport protein 來作為 surface marker，調控 vesicle 在膜上的 docking 與 fusion，但是粒線體的膜上並沒有這類的蛋白，所以胺基酸也無法以 vesicle trafficking 的方式到達粒線體。然而還有一種可能性，我們知道粒線體是一種高度動態的胞器，能夠以微管 (microtubules) 作為軌道，在細胞內快速的移動，還能與其他粒線體融合成線狀 (fusion)，也會分裂成單獨的粒線體 (fission)，這些動態特性與代謝有密切的關係，根據這些特性推測，可能有一部分的粒線體會移動到細胞膜 nutrient transporter 附近直接獲取胺基酸。BAD complex 可能參與其中，BAD complex 內的 WAVE-1 會調控粒線體的分佈，WAVE-1 的磷酸化狀態會影響 Arp2/3 控制的 actin polymerization，這個功能可能可以讓粒線體移動到細胞膜 nutrient transporter 附近，或是幫助粒線體在 nutrient transporter 附近固定其位置，讓粒線體能夠穩定的接收胺基酸。而 BAD (S136) 會被 Akt-S473 磷酸化，所以 BAD (S136) 到細胞膜被 mTORC2-Akt (Ser473) 磷酸化這個事件可能就反應粒線體已經藉由 BAD complex 的幫忙被 recruit 到細胞膜 nutrient transporter 附近獲取胺基酸。

5.3 p-BAD (Ser136), p-BAD (Ser155) 的細胞學意義

若是有一群粒線體藉由 BAD complex 的幫助分佈在 nutrient transporter 附近獲取胺基酸這個可能性為真，考慮 BAD 跟 Bcl-2, Bcl-xL 的交互作用，還有 Bcl-2,



Bcl-xL 在 voltage-dependent anion channels (VDAC) 的開關上的調控，推測胺基酸可能是經由 VDAC 進入粒線體中，當粒線體被 mTORC2-Akt (Ser473) signaling recruit 到細胞膜 nutrient transporters 附近後，BAD (Ser136) 被磷酸化，但此時 BAD (Ser155) 尚未被磷酸化，BAD 跟 Bcl-2, Bcl-xL 的結合相對緊密 (因為 Ser155 的磷酸化是 BAD 離開 Bcl-2, Bcl-xL 的決定步驟)，VDAC 的通透性較高，使得胺基酸由 VDAC 進入粒線體中代謝，然後經由 anaplerosis 活化 cAMP-PKA signaling，當胺基酸獲取達到飽和，由 BAD complex 整合的 cAMP-PKA signaling 就會磷酸化 BAD (Ser155)，將 VDAC 的通透性降低，完成獲取胺基酸的工作。然後可能因為 BAD 離開 Bcl-2, Bcl-xL 或者因為 BAD (Ser136) 磷酸化的下降，粒線體就會離開 nutrient transporter 的位置，去執行其他的功能 (可能是 cataplerosis)。當我們對細胞處理 AOA、BPTES 時，可能就是讓粒線體卡在能夠獲取胺基酸進入粒線體，但又無法代謝產生 cAMP-PKA signaling 的狀態，所以才會觀察到 mTORC1 活性下降，mTORC2 活性上升，和 p-BAD (Ser136) 上升，p-BAD (Ser155) 下降的現象。然而當處理 PKA inhibitor, H89 時，雖然整體的情況類似，但是粒線體的胺基酸代謝並未受到抑制，所以 mTORC1 的活性並未如同其他處理下降，反而因為無法終止反應不斷接收胺基酸使得 mTORC1 活性上升。

本篇研究提出了粒線體 anaplerosis/cataplerosis 反應營養可得性進而影響 mTORCs 活性其中可能的調控機制，未來可以此機制為藍本，做更進一步的推演與實驗。

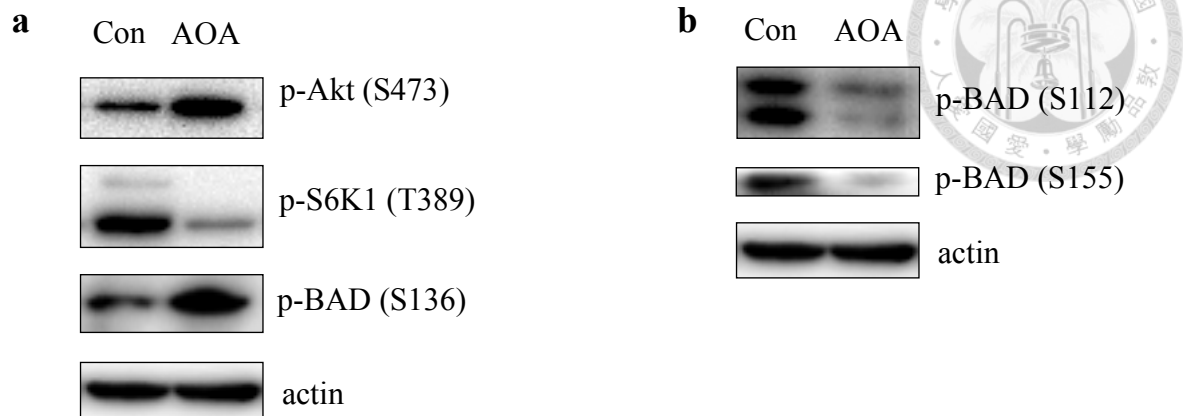
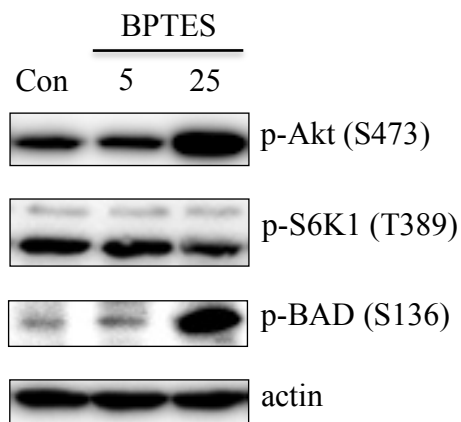
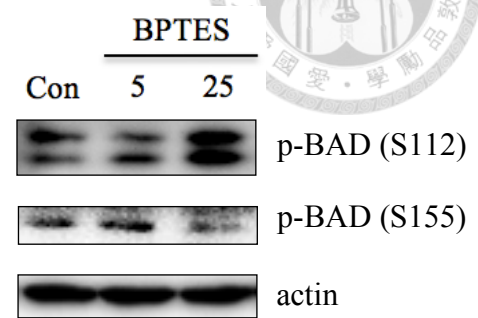


Figure 1

U2OS cells 處理 3 mM 的 AOA 12 小時，以 western blot 偵測的表現量。(a) AOA 處理使得 Akt(S473)磷酸化上升，S6K-1(T389)磷酸化下降；代表 mTORC2 活性上升，mTORC1 活性下降。也觀察到 BAD(S136)磷酸化上升。(b) BAD(S112, S155)磷酸化下降。

a**b****Figure 2**

U2OS cells 分別處理 5 μ M, 25 μ M 的 BPTES 6 小時，以 western blot 偵測表現量。

(a) 25 μ M BPTES 處理使得 Akt(S473)磷酸化上升，S6K-1(T389)磷酸化下降；代表 mTORC2 活性上升，mTORC1 活性下降。也觀察到 BAD(S136)磷酸化上升。(b) BAD(S112)磷酸化上升，BAD(S155)磷酸化下降。

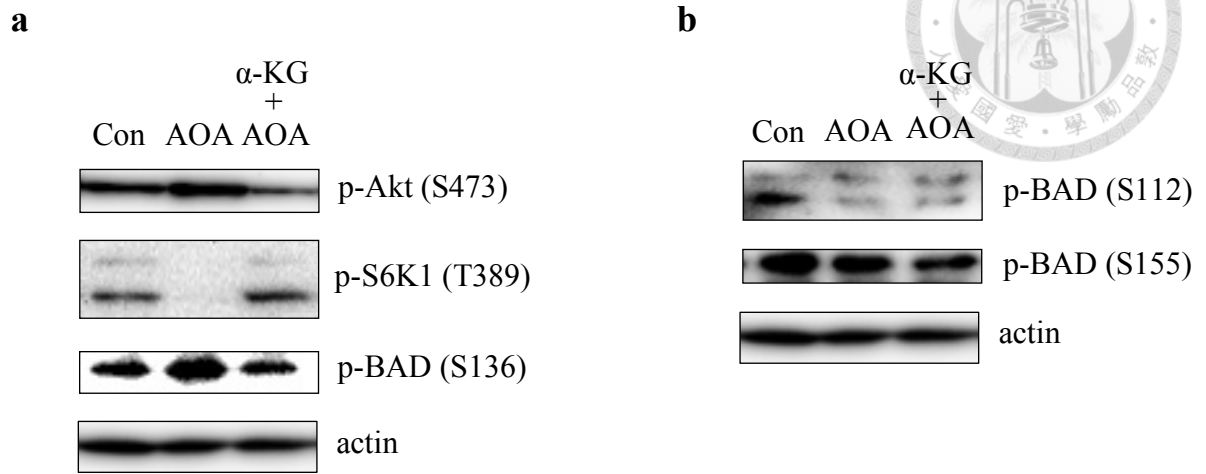
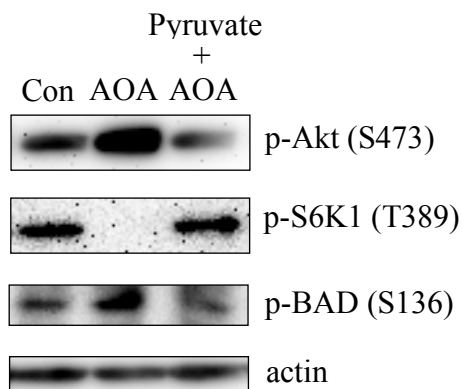
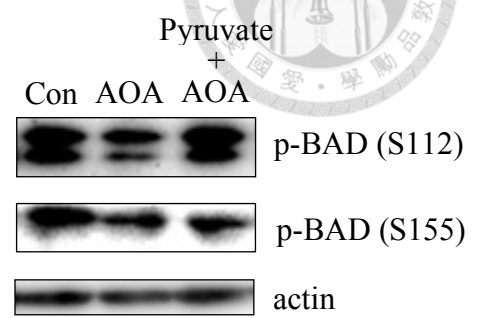
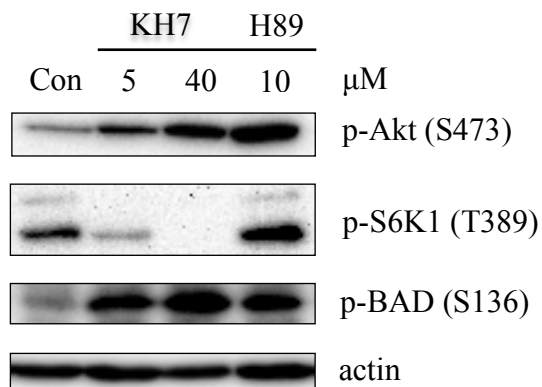
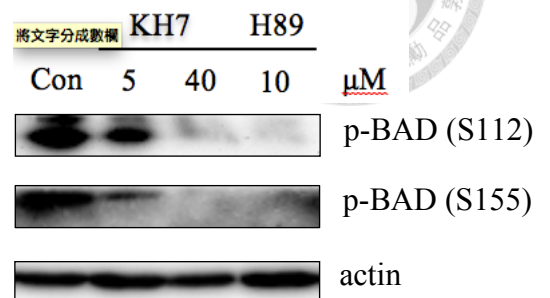


Figure 3

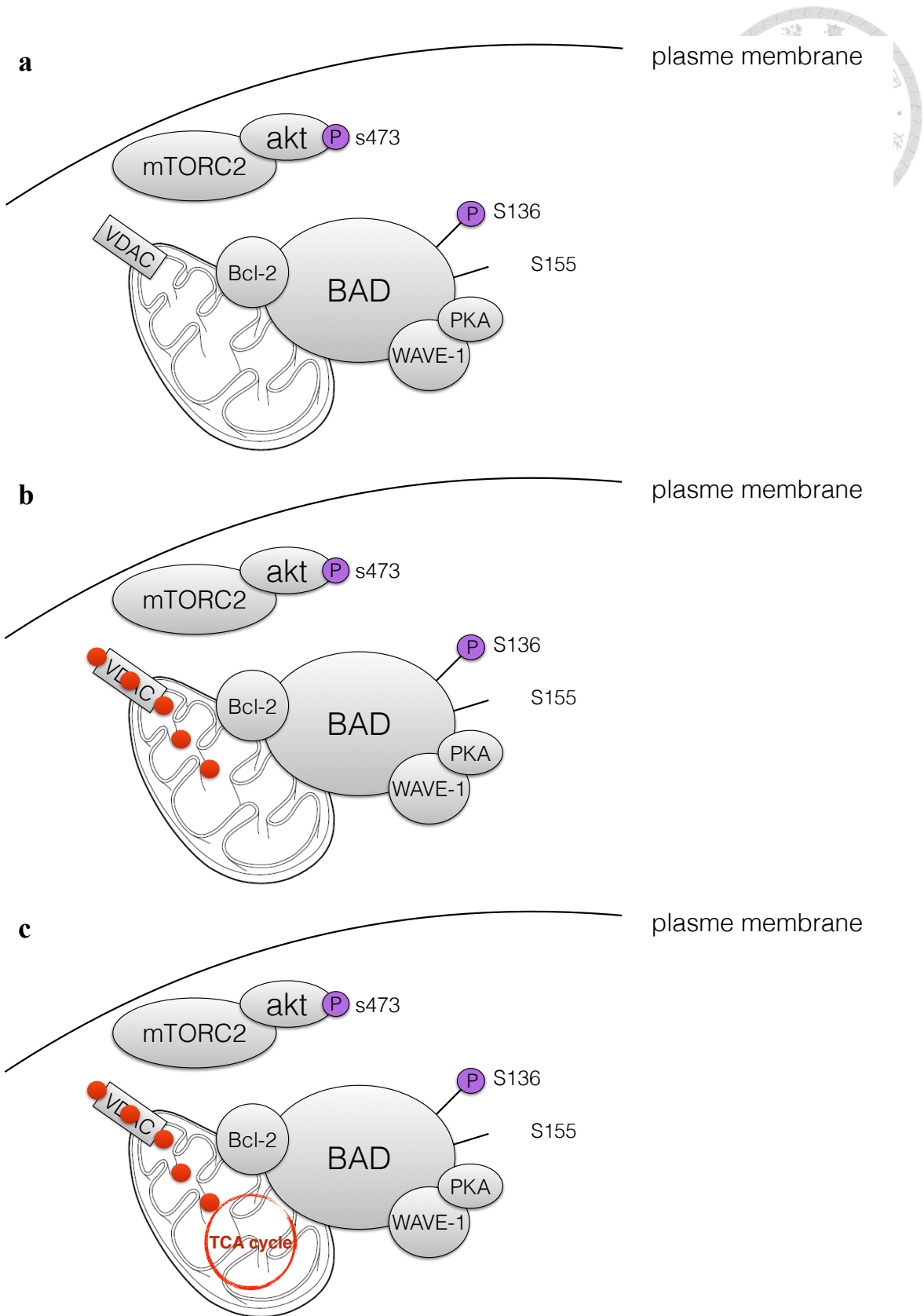
U2OS cells 共同處理 3 mM AOA 與 5 mM α -KG 12 小時，以 western blot 偵測表現量。(a) α -KG 可以回復 AOA 所使得 Akt(S473)磷酸化上升，S6K-1(T389)磷酸化下降，BAD(S136)磷酸化上升的效果。(b) AOA 無法回復 AOA 造成的 BAD(S112, S155)磷酸化下降。

a**b****Figure 4**

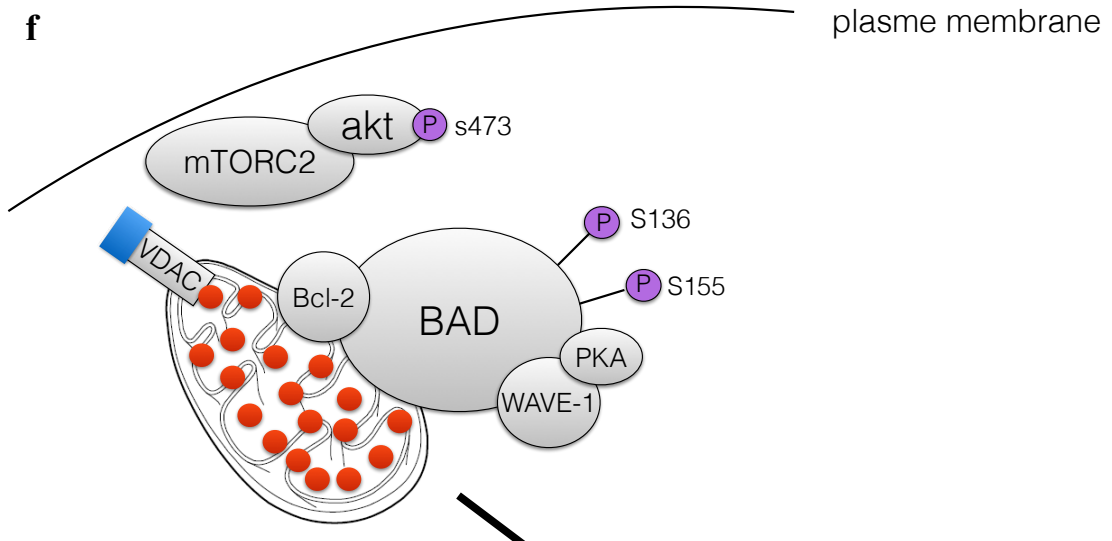
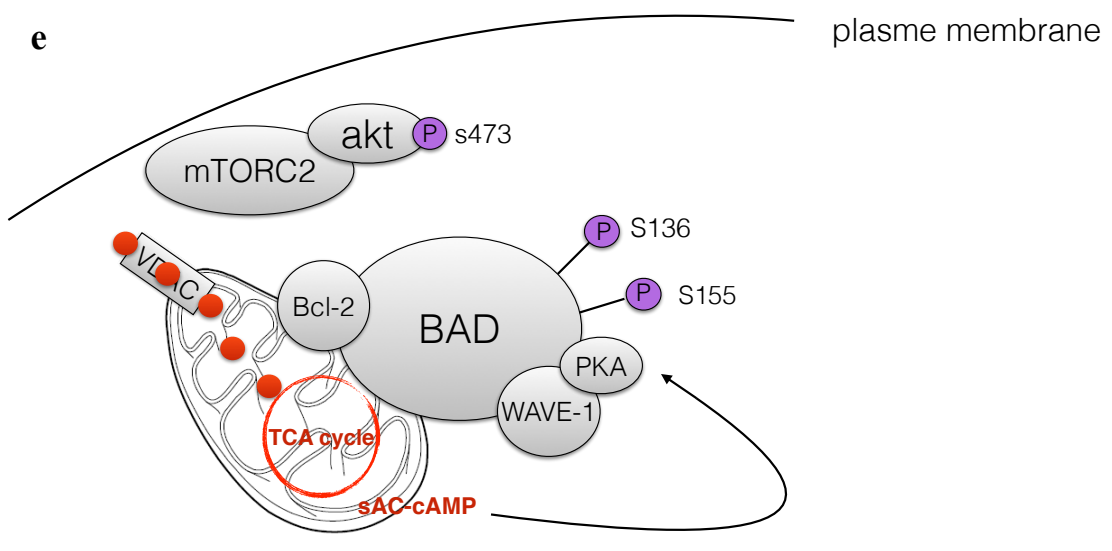
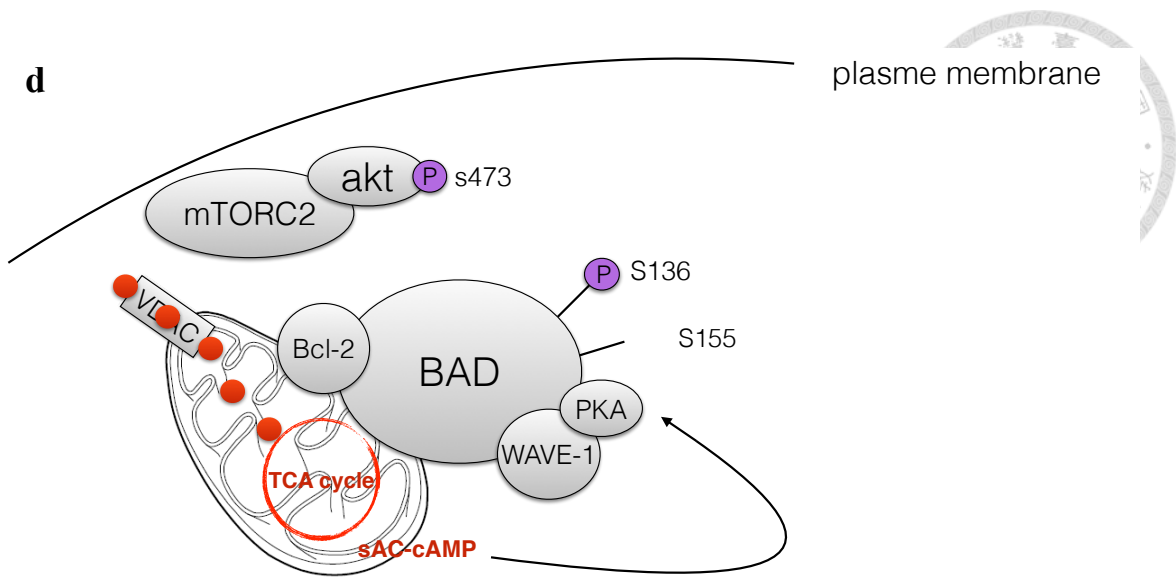
U2OS cells 共同處理 3 mM AOA 與 3 mM Pyruvate 12 小時，以 western blot 偵測表現量。(a) pyruvate 可以回復 AOA 所使得 Akt(S473)磷酸化上升，S6K-1(T389)磷酸化下降，BAD(S136)磷酸化上升的效果。(b) pyruvate 可以回復 AOA 所造成的 BAD(S112)磷酸化下降，但無法回復 BAD(S155)磷酸化下降。

a**b****Figure 5**

U2OS cells 分別處理 5 μM , 40 μM KH7 和 10 μM H89 , 6 小時, 以 western blot 偵測表現量。(a) KH7 處理使得 Akt(S473)磷酸化上升, S6K-1(T389)磷酸化下降; 代表 mTORC2 活性上升, mTORC1 活性下降。H89 處理使得 Akt(S473)磷酸化上升, S6K-1(T389)磷酸化上升; 代表 mTORC2 和 mTORC1 活性皆上升。KH7 和 H89 處理皆造成 BAD(S136)磷酸化上升。(b) KH7 和 H89 處理皆造成 BAD(S112, S155)磷酸化下降。



※未照實際比例繪製



※未照實際比例繪製

Cataplerosis

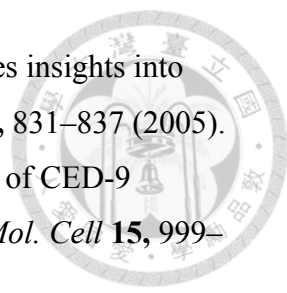
Appendix 1

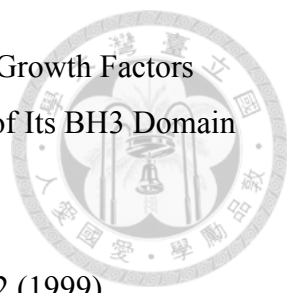
本論文所提出 Model 之示意圖。(a)BAD(S136)被 mTORC2-Akt(S473)磷酸化, 代表可能有一群粒線體位於細胞膜附近。(b)此時 BAD(S155)未被磷酸化, BAD 與 Bcl-2 的結合相對緊密, VDAC 通透性增加, 胺基酸由 VDAC 進入粒線體。(c)進入粒線體的胺基酸補充 TCA cycle (anaplerosis)。(d)Anaplerosis 驅動 TCA cycle 活化 sAC 進而產生 cAMP-PKA signaling。(e) cAMP-PKA signaling 由 BAD complex 整合, 當 cAMP-PKA signaling 累積到一定程度後, BAD(S155)被磷酸化。(f)因為 BAD(S155)的磷酸化, BAD 與 Bcl-2 結合降低, VDAC 通透性減少, 胺基酸獲取完成, 粒線體接著進行 cataplerosis 或其他功能。

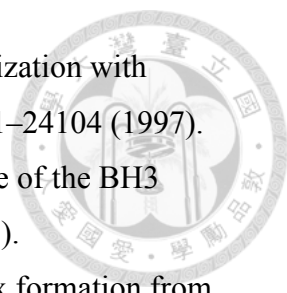
Reference

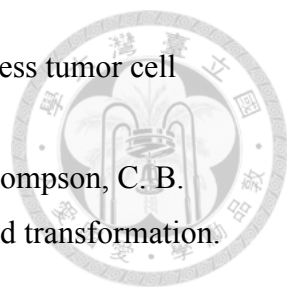



1. Youle, R. J. & Strasser, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 47–59 (2008).
2. Yang, E. *et al.* Bad, a heterodimeric partner for Bcl-xL and Bcl-2, displaces bax and promotes cell death. *Cell* **80**, 285–291 (1995).
3. Adams, J. M. & Cory, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**, 1324–1337 (2007).
4. Evan, G. I. *et al.* Oncogene-dependent tumor suppression: using the dark side of the force for cancer therapy. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **70**, 263–273 (2005).
5. Strasser, A., Harris, A. W., Bath, M. L. & Cory, S. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* **348**, 331–333 (1990).
6. Adams, J. M. & Cory, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322–1326 (1998).
7. Zha, H., Aimé-Sempé, C., Sato, T. & Reed, J. C. Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *J. Biol. Chem.* **271**, 7440–7444 (1996).
8. Oltvai, Z. N., Milliman, C. L. & Korsmeyer, S. J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609–619 (1993).
9. Hakem, R. *et al.* Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* **94**, 339–352 (1998).
10. Tsujimoto, Y., Shimizu, S., Narita, M. & Tsujimoto, Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**, 483–487 (1999).
11. Hardwick, J. M., Chen, Y.-B. & Jonas, E. A. Multipolar functions of BCL-2 proteins link energetics to apoptosis. *Trends in Cell Biology* **22**, 318–328 (2012).
12. Conradt, B. Genetic Control of Programmed Cell Death During Animal Development. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091533>


- 
13. Yan, N. *et al.* Structure of the CED-4-CED-9 complex provides insights into programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **437**, 831–837 (2005).
 14. Yan, N. *et al.* Structural, biochemical, and functional analyses of CED-9 recognition by the proapoptotic proteins EGL-1 and CED-4. *Mol. Cell* **15**, 999–1006 (2004).
 15. Jagasia, R., Grote, P., Westermann, B. & Conradt, B. DRP-1-mediated mitochondrial fragmentation during EGL-1-induced cell death in *C. elegans*. *Nature* **433**, 754–760 (2005).
 16. Rolland, S. G., Lu, Y., David, C. N. & Conradt, B. The BCL-2-like protein CED-9 of *C. elegans* promotes FZO-1/Mfn1,2- and EAT-3/Opa1-dependent mitochondrial fusion. *jcb.rupress.org*
 17. Lu, Y., Rolland, S. G. & Conradt, B. A molecular switch that governs mitochondrial fusion and fission mediated by the BCL2-like protein CED-9 of *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, E813–22 (2011).
 18. Li, H. *et al.* Bcl-xL induces Drp1-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 2169–2174 (2008).
 19. Hoppins, S. *et al.* The soluble form of Bax regulates mitochondrial fusion via MFN2 homotypic complexes. *Mol. Cell* **41**, 150–160 (2011).
 20. Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. & Korsmeyer, S. J. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* **87**, 619–628 (1996).
 21. Datta, S. R. *et al.* 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol. Cell* **6**, 41–51 (2000).
 22. Tan, Y. BAD Ser-155 Phosphorylation Regulates BAD/Bcl-XL Interaction and Cell Survival. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 25865–25869 (2000).
 23. Lizcano, J. M., Morrice, N. & Cohen, P. Regulation of BAD by cAMP-dependent protein kinase is mediated via phosphorylation of a novel site, Ser155. *Biochem. J.* **349**, 547–557 (2000).
 24. Virdee, K., Parone, P. & Tolkovsky, A. Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BAD on serine 155, a novel site, contributes to cell survival. *Curr. Biol.* **10**, R883 (2000).

- 
25. Zhou, X.-M., Liu, Y., Payne, G., Lutz, R. J. & Chittenden, T. Growth Factors Inactivate the Cell Death Promoter BAD by Phosphorylation of Its BH3 Domain on Ser155.
26. Harada, H. *et al.* Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol. Cell* **3**, 413–422 (1999).
27. Fang, X. *et al.* Regulation of BAD phosphorylation at serine 112 by the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *Oncogene* **18**, 6635–6640 (1999).
28. Scheid, M. P., Schubert, K. M. & Duronio, V. Regulation of bad phosphorylation and association with Bcl-x(L) by the MAPK/Erk kinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 31108–31113 (1999).
29. Datta, S. R. *et al.* Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**, 231–241 (1997).
30. Eves, E. M. *et al.* Akt, a Target of Phosphatidylinositol 3-Kinase, Inhibits Apoptosis in a Differentiating Neuronal Cell Line. *mcb.asm.org*
31. del Peso, L., González-García, M., Page, C., Herrera, R. & Nuñez, G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* **278**, 687–689 (1997).
32. Blume-Jensen, P., Janknecht, R. & Hunter, T. The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr. Biol.* **8**, 779–782 (1998).
33. Harada, H., Andersen, J. S., Mann, M., Terada, N. & Korsmeyer, S. J. p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD.
34. Masters, S. C., Yang, H., Datta, S. R., Greenberg, M. E. & Fu, H. 14-3-3 Inhibits Bad-Induced Cell Death through Interaction with Serine-136. *molpharm.aspetjournals.org*
35. Chiang, C.-W. *et al.* Protein Phosphatase 2A Dephosphorylation of Phosphoserine 112 Plays the Gatekeeper Role for BAD-Mediated Apoptosis. *mcb.asm.org*
36. Otilie, S. *et al.* Dimerization properties of human BAD. Identification of a BH-3 domain and analysis of its binding to mutant BCL-2 and BCL-XL proteins. *J. Biol. Chem.* **272**, 30866–30872 (1997).

- 
37. Zha, J. *et al.* BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity. *J. Biol. Chem.* **272**, 24101–24104 (1997).
38. Kelekar, A. & Thompson, C. B. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends in Cell Biology* **8**, 324–330 (1998).
39. Petros, A. M. *et al.* Rationale for Bcl-XL/Bad peptide complex formation from structure, mutagenesis, and biophysical studies. *Protein Science* **9**, 2528–2534 (2000).
40. Danial, N. N. *et al.* BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* **424**, 952–956 (2003).
41. Danial, N. N. *et al.* Dual role of proapoptotic BAD in insulin secretion and beta cell survival. *Nat Med* **14**, 144–153 (2008).
42. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science Signaling* **324**, 1029 (2009).
43. DeBerardinis, R. J., Lum, J. J. & Hatzivassiliou, G. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metabolism* (2008).
44. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* **123**, 309–314 (1956).
45. Moreno Sánchez, R., Rodríguez Enríquez, S., Marín Hernández, A. & Saavedra, E. Energy metabolism in tumor cells. *Febs Journal* **274**, 1393–1418 (2007).
46. Guppy, M., Greiner, E. & Brand, K. The role of the Crabtree effect and an endogenous fuel in the energy metabolism of resting and proliferating thymocytes. *Eur. J. Biochem.* **212**, 95–99 (1993).
47. Sayed, El, S. M. *et al.* Warburg effect increases steady-state ROS condition in cancer cells through decreasing their antioxidant capacities (anticancer effects of 3-bromopyruvate through antagonizing Warburg effect). *Med. Hypotheses* **81**, 866–870 (2013).
48. Curi, R., Newsholme, P. & Newsholme, E. A. Metabolism of pyruvate by isolated rat mesenteric lymphocytes, lymphocyte mitochondria and isolated mouse macrophages. *Biochem. J.* **250**, 383–388 (1988).
49. Fantin, V. R., St-Pierre, J. & Leder, P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* **9**, 425–434 (2006).

- 
50. Hatzivassiliou, G. *et al.* ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell* **8**, 311–321 (2005).
51. Bauer, D. E., Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Andreadis, C. & Thompson, C. B. ATP citrate lyase is an important component of cell growth and transformation. *Oncogene* **24**, 6314–6322 (2005).
52. Kuhajda, F. P. *et al.* Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy.
53. Parlo, R. A. & Coleman, P. S. Enhanced rate of citrate export from cholesterol-rich hepatoma mitochondria. The truncated Krebs cycle and other metabolic ramifications of mitochondrial membrane cholesterol. *jbcr.org*
54. Kovacevic, Z. & McGivan, J. D. Mitochondrial metabolism of glutamine and glutamate and its physiological significance. *Physiol. Rev.* **63**, 547–605 (1983).
55. EAGLE, H., OYAMA, V. I., LEVY, M., HORTON, C. L. & FLEISCHMAN, R. The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid. *J. Biol. Chem.* **218**, 607–616 (1956).
56. Medina, M. A., Sánchez-Jiménez, F., Márquez, J., Rodríguez Quesada, A. & Núñez de Castro, I. Relevance of glutamine metabolism to tumor cell growth. *Mol. Cell. Biochem.* **113**, 1–15 (1992).
57. E, N., B, C. & M, A. The role of high rates of glycolysis and glutamine utilization in rapidly dividing cells. *Bioscience reports* (1985).
58. Portais, J. C., Voisin, P., Merle, M. & Canioni, P. Glucose and glutamine metabolism in C6 glioma cells studied by carbon 13 NMR. *Biochimie* **78**, 155–164 (1996).
59. Brand, K. Glutamine and glucose metabolism during thymocyte proliferation. Pathways of glutamine and glutamate metabolism. *Biochem. J.* **228**, 353–361 (1985).
60. Deberardinis, R. J. *et al.* Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 19345–19350 (2007).
61. Yuneva, M., Zamboni, N., Oefner, P., Sachidanandam, R. & Lazebnik, Y. Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *The Journal of Cell Biology* **178**, 93–105 (2007).

- 
62. Forbes, N. S., Meadows, A. L., Clark, D. S. & Blanch, H. W. Estradiol stimulates the biosynthetic pathways of breast cancer cells: detection by metabolic flux analysis. *Metab. Eng.* **8**, 639–652 (2006).
63. Zhang, Y. *et al.* Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nat. Cell Biol.* **5**, 578–581 (2003).
64. Manning, B. D. Balancing Akt with S6K. *The Journal of Cell Biology* (2004).
65. Harrington, L. S., Findlay, G. M. & Lamb, R. F. Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 35–42 (2005).
66. Kim, E. & Guan, K.-L. RAG GTPases in nutrient-mediated TOR signaling pathway. *cc* **8**, 1014–1018 (2009).
67. Sancak, Y. & Sabatini, D. M. Rag proteins regulate amino-acid-induced mTORC1 signalling. *Biochem. Soc. Trans* **37**, 289 (2009).
68. Sancak, Y. *et al.* Ragulator-Rag Complex Targets mTORC1 to the Lysosomal Surface and Is Necessary for Its Activation by Amino Acids. *Cell* **141**, 290–303 (2010).
69. Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T. P. & Guan, K.-L. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat. Cell Biol.* **10**, 935–945 (2008).
70. Groenewoud, M. J. & Zwartkruis, F. J. T. Rheb and Rags come together at the lysosome to activate mTORC1. *Biochem. Soc. Trans* **41**, 951–955 (2013).
71. Sancak, Y. *et al.* The Rag GTPases Bind Raptor and Mediate Amino Acid Signaling to mTORC1. *Science* **320**, 1496–1501 (2008).
72. Hall, R. D. W. O. A. R. L. H. R. S. E. G. M. *et al.* Glutaminolysis Activates Rag-mTORC1 Signaling. *Mol. Cell* **47**, 349–358 (2012).
73. SHAW, R. mTOR signaling: RAG GTPases transmit the amino acid signal. *Trends in Biochemical Sciences* **33**, 565–568 (2008).
74. Sarbassov, D. D., Ali, S. M. & Sabatini, D. M. Growing roles for the mTOR pathway. *Current opinion in cell biology* (2005).
75. Tang, H. *et al.* Amino Acid-Induced Translation of TOP mRNAs Is Fully Dependent on Phosphatidylinositol 3-Kinase-Mediated Signaling, Is Partially Inhibited by Rapamycin, and Is Independent of S6K1 and rpS6 Phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 8671–8683 (2001).

- 
76. Richter, J. D. & Sonenberg, N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nat. Cell Biol.* **433**, 477–480 (2005).
77. Lu, M., Wang, J., Ives, H. E. & Pearce, D. mSIN1 protein mediates SGK1 protein interaction with mTORC2 protein complex and is required for selective activation of the epithelial sodium channel. *J. Biol. Chem.* **286**, 30647–30654 (2011).
78. Sarbassov, D. D. *et al.* Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol.* **14**, 1296–1302 (2004).
79. Manning, B. D. & Cantley, L. C. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* **129**, 1261–1274 (2007).
80. Dong, S. *et al.* 14-3-3 Integrates prosurvival signals mediated by the AKT and MAPK pathways in ZNF198-FGFR1-transformed hematopoietic cells. *Blood* **110**, 360–369 (2007).
81. Acin-Perez, R. *et al.* Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation. *Cell Metabolism* **9**, 265–276 (2009).
82. Weninger, S., De Maeyer, J. H. & Lefebvre, R. A. Study of the regulation of the inotropic response to 5-HT₄ receptor activation via phosphodiesterases and its cross-talk with C-type natriuretic peptide in porcine left atrium. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **385**, 565–577 (2012).
83. Sung, J. Y. *et al.* WAVE1 controls neuronal activity-induced mitochondrial distribution in dendritic spines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 3112–3116 (2008).
84. Partovian, C., Ju, R., Zhuang, Z. W., Martin, K. A. & Simons, M. Syndecan-4 Regulates Subcellular Localization of mTOR Complex2 and Akt Activation in a PKC α -Dependent Manner in Endothelial Cells. *Mol. Cell* (2008).