

**Diplomarbeit**

**Verzweigkettige Aminosäuren - Spezieller  
Stoffwechselweg und Zusammenhang mit den klinischen  
Krankheitsbildern des Diabetes Mellitus und des  
Pankreaskarzinoms**

eingereicht von

**Ario Fotohi**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde**

**(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt am

**Klinisches Institut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik**

unter der Anleitung von

**Priv.-Doz. Dr. Dietmar Enko, MSc, MBA, LL.M.**

**Priv.-Doz. Mag. Dr.scient.med. Andreas Meinitzer**

Graz, am 13.09.2023

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 13.09.2023

Ario Fotohi eh.

## **Danksagungen**

Zunächst möchte ich meinem Betreuer Herrn Dr. Enko meinen tiefsten Dank für die Unterstützung, Geduld und das Lektorat aussprechen. Ihre Expertise und ihr wertvolles Feedback waren bei der Herangehensweise der Diplomarbeit eine große Hilfestellung.

Ich möchte auch meinem Zweitbetreuer Dr. Meinitzer herzlich danken.

Der größte Dank gilt meiner Familie. Ihr Glaube an mich, ihre bedingungslose Liebe und Unterstützung, insbesondere in den herausforderndsten Zeiten während des Studiums und über dieses hinaus, waren unersetzlich und haben mich motiviert mein Ziel nicht aus den Augen zu verlieren. Ohne euch hätte ich diesen Weg nicht bestreiten können.

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abkürzungen und deren Erklärung.....	6
Abbildungsverzeichnis.....	10
Zusammenfassung in Deutsch.....	11
Abstract.....	12
1 Einleitung.....	13
2 Ergebnisse.....	14
2.1 BCAAs.....	14
2.1.1 BCAA Katabolismus.....	15
2.1.2 Störung im BCAA Katabolismus.....	18
2.2 mTOR.....	19
2.2.1 Biochemie von mTOR.....	20
2.2.2 Aktivierung von mTOR.....	21
2.2.3 Der Einfluss von BCAAs auf mTOR unter physiologischen Bedingungen...	21
2.2.4 Signalweg von mTOR.....	26
2.3 Diabetes.....	29
2.3.1 BCAAs und der Zusammenhang zwischen IR und Diabetes Mellitus Typ 2	31
2.3.2 Andere Mechanismen.....	38
2.4 Rolle von mTOR auf die Diabetesentstehung.....	40
2.4.1 Rolle von mTOR1 auf die Diabetesentstehung.....	41
2.4.2 Die Rolle von mTOR2 bei Diabetesentstehung.....	44
2.4.3 BCAAs als Früherkennungsmarker für IR und Diabetes.....	45
2.5 Tumore Einleitung.....	52
2.5.1 Pankreaskarzinome.....	53
2.5.2 PDAC Diagnostik.....	55
2.5.3 Pathogenese des PDAC.....	55
2.6 Einfluss des BCAA-Stoffwechsels auf die Pankreaskarzinomentstehung.....	57
2.7 Rolle von mTOR auf die Tumorentstehung.....	60
2.7.1 Rolle von mTOR bei Pankreaskarzinomen.....	63
2.8 BCAA als Marker für PDAC.....	65
3 Diskussion.....	69
3.1 Diabetes.....	69

3.1.1 MTOR Wirkung.....	70
3.1.2 BCAA als Folge/Marker für IR und Diabetes .....	71
3.2 Krebs Diskussion.....	77
3.2.1 Rolle von BCAA auf die Tumorentstehung .....	77
3.2.3 BCAAs als Marker .....	84
3.2.4 Marker für Vorläuferläsionen .....	87
3.3 Abschlussbetrachtung .....	88
3.3.1 Diabetes .....	88
3.3.1 Pankreaskarzinom.....	90
4 Literaturverzeichnis .....	92

## Abkürzungen und deren Erklärung

- 3-HIB - 3-Hydroxyisobutyrat (auch bekannt als 3-Hydroxyisobuttersäure)
- 4EBP - eIF4E-bindendes Protein 1 (4E-BP1)
- AAA - Aromatische Aminosäuren
- AC - Acylcarnitine
- Acetyl-CoA - Acetyl-Coenzym A
- AKT - Proteinkinase B
- AMP - Adenosinmonophosphat
- AMPK - Adenosine monophosphate-activated protein kinase
- ARIC - Atherosclerosis Risk in Communities
- ATP - Adenosintriphosphat
- BCAT - Verzweigt-kettige Aminotransferase
- BCAT1 - Verzweigt-kettige Aminotransferase 1
- BCAT2 - Verzweigt-kettige Aminotransferase 2
- BCATc - Cytosolic branched-chain amino acid aminotransferases
- BCATm - Mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferases
- BCAAs - Branched chain amino acids
- BCKA - Branched Chain Keto Acids
- BCKDH-Komplex - Branched-Chain Ketoacid Dehydrogenase Komplex
- BMI - Body Mass Index
- BRCA2 - breast cancer 2, DNA-Reparatur assoziiert
- bspw. – Beispielsweise
- CA 19-9 - Kohlenhydrat-Antigen 19-9
- CEA - Karzinoembryonales Antigen
- CDKN2A - Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor 2A
- CT - Computertomographie
- DEPTOR - DEP domain-containing mTOR-interacting protein
- EAA - Essentielle Aminosäuren
- EGF - Epidermal Growth Factor
- EGFR - Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
- ELSA-Brasil - Estudo Longitudinal de Saúde Adulta
- ER - Endoplasmatisches Retikulum
- ERCP - Endoskopische retrograde Cholangiopankreatographie

- ERF - Erasmus-Rucphen-Familienstudie
- ERK - Extracellular signal-regulated kinases
- EUS - Endoskopischer Ultraschall
- FHS - Framingham Heart Study
- GAP - GTPase-aktivierendes Protein
- GATOR1 - GTPase-aktivierendes Protein Toward Rags1
- GATOR2 - GTPase-aktivierendes Protein Toward Rags 2
- GβL - G protein beta-like protein (Teil von mTOR-Komplexen)
- GEFs - Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren
- GDP - Guanosindiphosphat
- GLP-1 - Glucagon-like Peptid-1
- GLUD1 - Glutamat-Dehydrogenase
- GTP - Guanosintriphosphat
- HbA1c - Hämoglobin A1c
- HCC - Hepatozelluläres Karzinom
- HDI - Human Development Index
- HDL - High-Density-Lipoprotein
- HIF - Hypoxie-induzierbarer Faktor
- HIF-1α - Hypoxie-induzierbarer Faktor 1α
- HOMA-IR - Homeostasis Model Assessment für IR
- IDF - International Diabetic Federation
- IGF-1 - Insulin-like Growth Factor-1
- IGF-1R - Insulin-like growth factor-1-Rezeptor
- IGFs - Insulinähnliche Wachstumsfaktoren
- IGFR - Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-Rezeptor
- INK128 - Ein mTOR-Inhibitor
- INTERMAP - International Study of Macro-/Micronutrients and Blood Pressure
- IPMN - Intraduktale papilläre muzinöse Neoplasien
- IR - Insulinresistenz
- IRAS - Insulin Resistance Atherosclerosis Study
- IRS - Insulinrezeptorsubstrat
- IRS-1 und IRS-2 - Insulinrezeptorsubstrat 1 bzw. 2
- K-RAS - Kirsten Rat Sarcoma Virus

- LAT1 - L-type amino acid transporters
- LRS - Leucyl-tRNA-Synthetase
- MCN - Muzinöse zystische Neoplasien
- METSIM - Metabolic Syndrome in Men
- MEK - Mitogen-activated protein kinase
- mLST8 - Mammalian Lethal with Sec13 protein 8
- mRNA - Messenger-Ribonukleinsäure
- MRCP - Magnetresonanz-Cholangiopankreatographie
- MRT - Magnetresonanztomographie
- mTOR - Mechanistic/mammalian Target of Rapamycin
- mTORC1 - Mechanistic/mammalian Target of Rapamycin Complex 1
- mTORC2 - Mechanistic/mammalian Target of Rapamycin Complex 2
- NOTCH - Neurogenic locus notch homolog protein
- NSCLC - Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
- PANC - pancreatic cancer cell strains
- PanIN - pankreatische intraepitheliale Neoplasien
- PDK1 - 3-Phosphoinositid-abhängigen Proteinkinase-1
- PDGF- $\alpha$  - Platelet Derived Growth Factor- $\alpha$
- PDPK1 - 3-Phosphoinositid-abhängigen Proteinkinase-1
- PFAA - Freien Plasma-Aminosäuren
- PI3K - Phosphoinositid-3-Kinase
- PIKK - Phosphoinositid-3-Kinase-related kinase
- PIP2 - Phosphatidylinositol 4,5-(Bis-)phosphat
- PIP3 - Phosphatidylinositol 3,4,5-(Tri-)phosphat
- PKC $\epsilon$  - Protein Kinase C epsilon
- PKC- $\delta$  - Protein Kinase C delta
- PRAS40 - Proline-rich Akt substrate of 40 kDa
- PTEN - Phosphatase und Tensin-Homolog
- p70S6K - S6K1; früher p70 ribosomale S6-Kinase genannt
- RAG A/B/C/D - Ras-related GTP-binding protein A/B/C/D
- RAF - Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
- RAS - Rat sarcoma, RAS Protein
- RBP-4 - Retinol-Binding Protein 4

- raptor - Regulatory Associated Protein of TOR
- Rheb - Ras homolog enriched in brain
- Rictor - Rapamycin-insensitive companion of TOR
- SIN1 - Stress-activated map kinase-interacting protein 1
- SMAD4 - Mothers against decapentaplegic homolog 4
- T2DM - Typ-2-Diabetes Mellitus
- TBC1D7 - TBC1 Domain Family Member 7
- TGF- $\beta$  - Transforming Growth Factor- $\beta$
- TNF- $\alpha$  - Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$
- Trp53 - Tumorprotein p53
- TSC1 - Tuberöse-Sklerose-Protein-Komplexes 1
- TSC2 - Tuberöse-Sklerose-Protein-Komplexes 2
- u. a. - Unter anderem
- UK - Vereinigtes Königreich (United Kingdom)
- USA - Vereinigte Staaten von Amerika
- VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor
- WHS - Women's Health Study
- WNT - Wnt-Protein
- WLM - Weight Loss Maintenance
- YAP - Yes-associated protein

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Vereinfachte schematische Darstellung des BCAA-Katabolismus.

Abbildung 2: Stark vereinfachte Darstellung des Aminosäuretransporters LAT1/2.

Abbildung 3a: Vereinfachte Darstellung der Sestrin-vermittelten Regulierung von mTORC1 unter ungestressten Bedingungen.

Abbildung 3b: Vereinfachte Darstellung der Sestrin-vermittelten Regulierung von mTORC1 unter Stressbedingungen.

Abbildung 4: MTOR-Signalweg

Abbildung 5: Vorgeschlagener Mechanismus: BCAAs induzierte Insulinresistenz durch die Stimulierung von mTORC1.

Abbildung 6: MTOR-Beteiligung bei der Tumorentstehung.

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Literaturrecherche wird der komplexe Stoffwechsel der branched-chain amino acids (BCAAs) beleuchtet. BCAAs spielen nicht nur eine wichtige Rolle als Bausteine für Proteine, sondern beeinflussen auch zentrale metabolische Pfade, insbesondere den mTOR-Signalweg. Dieser Signalweg ist ein Schlüsselmechanismus für die Regulation von Zellwachstum und -überleben und steht in direktem Zusammenhang mit dem Entstehen von Krankheiten wie Diabetes Mellitus Typ 2 und Pankreaskrebs.

Das Enzym mTOR ist eine zentrale Schaltstelle in vielen Stoffwechselwegen und kann durch BCAAs aktiviert werden. In der Regel fördert mTOR den Anabolismus, jedoch können übermäßige BCAA-Spiegel zu einer überschüssigen Aktivierung von mTOR und damit zu Insulinresistenz und erhöhten Blutzuckerwerten, welche Risikofaktoren für Typ-2-Diabetes sind, führen. Darüber hinaus ist mTOR auch in die Pathogenese von Pankreaskrebs involviert, da seine Überaktivierung das Tumorstromwachstum fördern kann.

Ebenso wird untersucht, ob BCAAs als (Früh-)erkennungsmarker für diese Krankheiten dienen können. Aktuelle Studien legen nahe, dass erhöhte BCAA-Spiegel als potenzielle Früherkennungsmarker für Insulinresistenz und Pankreaskrebs verwendet werden können, wobei weiterführende Studien für die endgültige Bestätigung noch ausstehen.

Die Relevanz dieser Forschung liegt in der Identifikation von präventiven, diagnostischen und therapeutischen Zielen. Durch ein besseres Verständnis der Wechselwirkungen zwischen BCAAs und mTOR könnten neue therapeutische Ansätze entwickelt werden, die bei der Behandlung oder sogar der Vorbeugung von Diabetes und Pankreaskrebs helfen könnten.

BCAAs können sowohl Risikofaktoren als auch potenzielle Biomarker für diese ernsthaften gesundheitlichen Zustände sein und die genauen Mechanismen dieser Beziehungen bedürfen weiterer eingehender Untersuchungen.

## **Abstract**

This current literature assessment delves into the intricate metabolic processes involving branched-chain amino acids (BCAAs). Going beyond basic structure and influencing key biological pathways, BCAAs hold profound significance within cellular dynamics. Directly involved in the genesis of type 2 diabetes mellitus and pancreatic cancer, this route serves as a vital accompanist for disease progression. Among several metabolic routes, mTOR acts like a vital intersection and is initialized via BCAAs.

Typically, mTOR fosters growth by supporting anabolic processes; yet, excessive concentrations of BCAAs can stimulate uncontrolled activation of mTOR, leading to increased insulin resistance and elevated glucose levels, becoming precursors for type 2 diabetes. Pancreatic cancer progression relies on mTOR's hyperactivity, allowing tumours to grow rapidly.

Looking deeper into the role of BCAAs as potential predictors, this review sheds light on their potential uses. Study results hint at abnormally increased BCAAs functioning as possible primal indicators of insulin deficiency or illness progression—but concrete confirmation necessitates extensive research.

Identification of these targets holds significance for proactive measures against the disease. Unveiling the complex dynamics between BCAAs and mTOR may shed light on innovative strategies to counteract diabetes and pancreatic tissue growth.

These associations indicate that BCAAs could serve either as indicators or threats; additional analysis will provide clarity on their roles.

# 1 Einleitung

BCAAs (branched chain amino acids, zu Deutsch: verzweigtkettige Aminosäuren) sind in der heutigen Zeit ein beliebtes und durch die Werbeindustrie sehr umworbenes Nahrungsergänzungsmittel in der Fitnessbranche. Sie sollen den Muskelkatabolismus verhindern und den Muskelerhalt sichern.

Die verzweigtkettigen Aminosäuren bestehen aus den drei essenziellen Aminosäuren Valin, Isoleucin und Leucin.

BCAAs unterscheiden sich nicht nur in der Biochemie von anderen Aminosäuren, sondern auch in ihrem Stoffwechselweg. Im Unterschied zu anderen Aminosäuren werden sie weniger in der Leber metabolisiert, stattdessen dienen sie in der Muskelzelle verstärkt als Substrat für die Proteinsynthese.

Es wird zunehmend Forschung rund um die BCAAs betrieben, dabei wird ihre Rolle bei der Entstehung von Krankheiten wie kardiovaskulärer Erkrankungen, Diabetes und Tumorerkrankungen näher beleuchtet. Einige Studien untersuchen, ob man diese auch als Marker zur (Früh-)erkennung von diesen Erkrankungen verwenden kann.

In dieser Literaturrecherche wird der Metabolismus der BCAAs beschrieben, der Einfluss dieser auf das Schlüsselenzym mTOR, wie diese zur Entstehung des Diabetes Mellitus Typ 2 und des Pankreaskarzinoms führen können und ob BCAAs als (Früh-)erkennungsmarker für diese Erkrankungen herangezogen werden können.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 BCAAs

L-Leucin war die erste verzweigtkettige Aminosäure, die von J.L. Proust 1819 entdeckt wurde. Im darauffolgenden Jahr wurde Leucin von H. Braconnot aus der Skelettmuskulatur und aus Wolle isoliert. E. Schulze veröffentlichte 1891 die Struktur von Leucin. Leucin ist von den drei verzweigtkettigen Aminosäuren, diejenige, die am reichlichsten sowohl im Pflanzeneiweiß als auch im Tiereiweiß vorhanden ist [1].

L-Valin wurde als zweite verzweigtkettige Aminosäure entdeckt. Sie wurde erstmals 1856 von E. von Gorup-Besanez aus Extrakten tierischer Gewebe (Leber, Pankreas, Milz, Thymus und Schilddrüse) isoliert. Valin wurde 1879 von P. Schützenberger aus einem sauren Hydrolysat von Albumin gewonnen und dann 1901 von E. Fischer aus einem pankreatischen Proteinhydrolysat. Die Struktur von Valin wurde 1906 durch chemische Synthese von E. Fischer festgelegt [1].

L-Isoleucin ist die letzte entdeckte verzweigtkettige Aminosäure und ist sowohl in pflanzlichen als auch in den meisten tierischen Proteinen reichlich vorhanden. Konkret wurde sie erstmals 1904 von F. Ehrlich aus Zuckerrübenmelasse isoliert. In den darauffolgenden Jahren wurde diese Aminosäure aus einer pankreatischen Verdauung von Fibrin sowie aus den sauren Hydrolysaten von Weizengluten, Eialbumin und Rindermuskeln gewonnen. 1907 berichtete F. Ehrlich, dass Isoleucin dieselbe chemische Zusammensetzung wie Leucin hat, sich jedoch in physikochemischen Eigenschaften wie Schmelzpunkt, optische Aktivität und Löslichkeit unterscheidet. Die Struktur von Isoleucin wurde 1908 durch dessen chemische Synthese von F. Ehrlich festgelegt [1].

Neben Alanin, Methionin und Prolin besitzen Leucin, Isoleucin und Valin unpolare aliphatische Seitenketten, wodurch sie relativ inert (reaktionsträge) sind.

BCAAs können entweder zur Proteinsynthese herangezogen oder durch ihren Abbau zur Energiegewinnung genutzt werden.

### **2.1.1 BCAA Katabolismus**

Bis 1965 wurde angenommen, dass BCAAs überwiegend in der Leber katabolisiert werden. Erst 1965 wurde bei Hunden ohne Leber festgestellt, dass sich die BCAA Konzentration im Plasma der Hunde bis zu 22h danach nicht verändert hatte. Diese Beobachtung wurde durch die Entdeckung gestützt, dass die Aktivität der BCAA Transaminase in der Leber eine sehr geringe Aktivität unter physiologischen BCAA Konzentrationen aufwies. Darauf folgende Arbeiten etablierten, dass die Skelettmuskulatur der Hauptort der BCAA Transamination war [1].

Basierend auf isotopischen und enzymologischen Studien schlug H.A. Krebs 1964 vor, dass der BCAA-Abbau die ersten drei gemeinsamen Schritte teilt: Transaminierung, oxidative Decarboxylierung und Acyl-CoA-Dehydrogenierung. Die ersten beiden Reaktionen sind heute bekannt dafür, hoch gewebespezifisch zu sein [1].

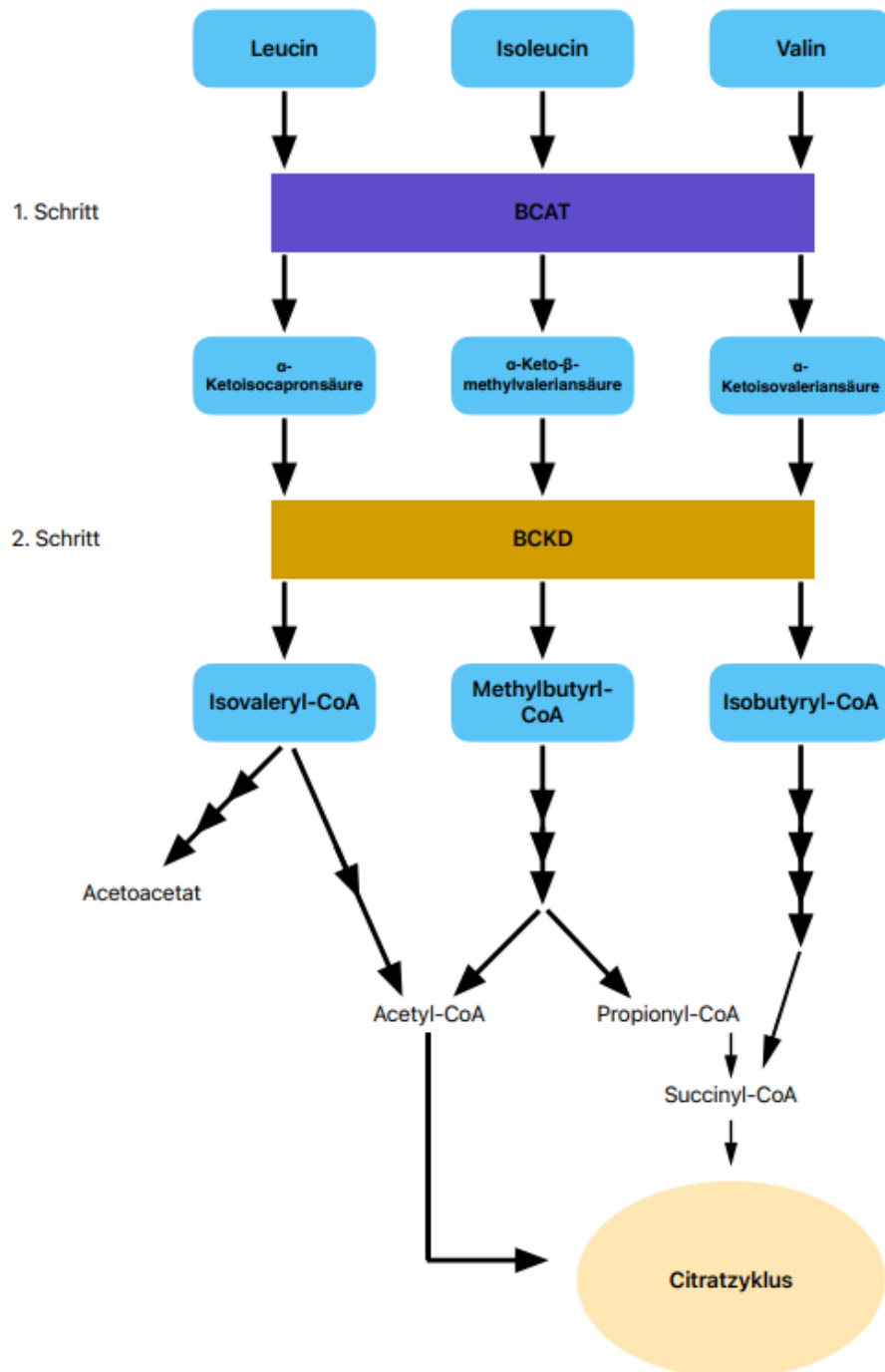


Abbildung 1: Vereinfachte schematische Darstellung des BCAA-Katabolismus. Modifiziert nach: [2].

Im ersten reversiblen Schritt werden die BCAAs durch die verzweigt-kettige Aminotransferase BCAT durch Transaminierung in verzweigt-kettige  $\alpha$ -Ketosäuren umgewandelt.

Dabei entstehen aus Isoleucin alpha-Keto-beta-Methylvaleriansäure, aus Leucin alpha-Ketoisocaproensäure und aus Valin alpha-Ketoisovaleriansäure.

In den Mitochondrien der Leber haben die BCAA Transaminasen eine sehr geringe Aktivität. Ebenso ist dieses Enzym im Zytosol der Hepatozyten weitaus geringer vorhanden als in der Skelettmuskulatur, den Nieren, dem Herzen und dem Dünndarm, wodurch die Transaminierung der BCAAs in der Leber stark limitiert ist. Es gibt zwei Isoformen der verzweigtkettigen Aminotransferase: BCAT1 (BCATc) und BCAT2 (BCATm). BCAT1 wird hauptsächlich in fetalen Geweben und in vielen adulten Geweben, insbesondere im Gehirn, exprimiert. BCAT2 hingegen ist die periphere Isoform, die in vielen Geweben außerhalb des Zentralnervensystems vorkommt, einschließlich der Skelettmuskulatur, den Nieren und der Leber. Außerdem kommt BCAT1 vor allem im Zytosol vor, während BCAT2 hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisiert ist.

Im Gegensatz dazu ist die Aktivität der Branched Chain Keto Acids- (BCKA) Dehydrogenase besonders in der Leber erhöht [1]. Aus diesem Grund werden die Metabolite der BCKA im peripheren Gewebe in den Kreislauf abgegeben und von der Leber metabolisiert.

Im Anschluss werden die verzweigtkettigen alpha-Ketosäuren durch den verzweigtkettigen alpha-Ketosäure Dehydrogenase Komplex (BCKD) an der inneren Mitochondrienmembran oxidiert und dekarboxyliert. Dieser Schritt erfordert mehrere Kofaktoren wie NAD<sup>+</sup> und FAD und generiert NADH und FADH<sub>2</sub>, die für die zelluläre Energiegewinnung wichtig sind. Nach der oxidativen Dekarboxylierung entstehen für Leucin Isovaleryl-CoA, für Isoleucin Methylbutyryl-CoA und für Valin Isobutyryl-CoA.

Die oxidative Decarboxylierung durch diesen multienzymatischen Komplex ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im BCAA-Metabolismus und wird durch verschiedene Mechanismen reguliert.

Isovaleryl-CoA wird zu Acetyl-CoA und Acetoacetat abgebaut. Methylbutyryl-CoA wird weiter zu Tiglyl-CoA und schließlich zu Propionyl-CoA und Acetyl-CoA

umgewandelt. Isobutyryl-CoA wird schließlich zu Methylacrylyl-CoA und dann zu Propionyl-CoA umgewandelt.

Das Succinyl-CoA aus dem Valin und Isoleucin Abbau wird dann in den Citratzyklus eingespeist, die in weiterer Folge u.a. zur indirekten Synthese von ATP führen.

Leucin ist rein ketogen. Die Metabolite von ketogenen Aminosäuren können in die Fettsäuresynthese bzw. Ketonkörper-Produktion einfließen.

Valin ist glukogen. Die Abbauprodukte der glukogenen Aminosäuren können in die Glukoneogenese einfließen.

Isoleucin ist sowohl ketogen als auch glukogen.

### **2.1.2 Störung im BCAA Katabolismus**

Die Ahornsirup-Krankheit ist die bekannteste Störung im BCAA-Katabolismus. Diese Erkrankung wird autosomal-rezessiv vererbt und ist durch einen Defekt im BCKDH-Komplex charakterisiert. Dieser Defekt führt in weiterer Folge zur Akkumulation der BCAAs und ihrer korrespondierenden alpha-Ketosäuren in den Körperflüssigkeiten. Die Ansammlung dieser Substanzen kann zu verschiedenen neurologischen und metabolischen Symptomen führen. Der Name der Krankheit stammt von dem charakteristischen Geruch des Urins der Betroffenen, der an Ahornsirup erinnert. Verantwortlich für diesen spezifischen Geruch ist die Substanz Sotolone, die im Isoleucin-Intermediärstoffwechsel entsteht [3]. Die Behandlung besteht oft aus einer speziellen Diät, die den Gehalt an BCAAs kontrolliert und regelmäßiger Überwachung, um potenzielle Komplikationen zu vermeiden [4].

Bei Neugeborenen manifestiert sich die Ahornsirupkrankheit oft in den ersten Lebenswochen durch schwere Symptome. Dazu zählen körperliche Entwicklungsstörungen und geistige Retardierung. Wenn die Betroffenen nicht behandelt werden, kann diese Stoffwechselerkrankung tödlich enden, verursacht durch Komplikationen wie Ketoazidose und Hirnödeme [3].

## 2.2 mTOR

MTOR (mechanistic/mammalian target of rapamycin) auch bekannt als FK506 binding protein 12-rapamycin-associated protein 1 oder FRAP, RAFT1, or RAPT) ist eine Serin/Threonin-Kinase, die zur Familie der Phosphoinositide-3-Kinase Related Kinase (PIKK) gehört. MTOR nimmt eine Schlüsselrolle im Metabolismus und Wachstum der eukaryotischen Zelle ein.

Rapamycin, ein Naturprodukt, das aus *Streptomyces hygroscopicus* isoliert wurde, wurde 1972 auf der Insel Rapa Nui entdeckt. Es besitzt antimykotische, immunsuppressive und krebshemmende Eigenschaften, die durch die Hemmung seines Ziels vermittelt werden [5].

MTOR dient als integraler Bestandteil verschiedener Signalwege, darunter der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), der insulinähnliche Wachstumsfaktor-Rezeptor (IGFR) und die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-AKT [6].

Daneben ist mTOR wichtig bei der Apoptose und Autophagie der Zelle [7].

Die durch Proteine in der Nahrung aufgenommenen Aminosäuren führen zur Aktivierung von mTOR, was zu einer erhöhten Proteinsynthese und Zellproliferation führt [8].

BCAAs spielen dabei eine wichtige Rolle. Sie machen mehr als 20 % der gesamten Proteinzufuhr aus und sind bekannte Aktivatoren des mTOR-Signalwegs in Muskel- und Epithelgewebe.

Die Aktivierung von mTOR wird durch die BCAAs besonders stark gefördert [9].

Dieser Effekt wird mittlerweile im Kraftsport und professionellem Bodybuilding genutzt, indem BCAAs und insbesondere das Leucin hochdosiert supplementiert werden, um die gewünschte Proteinbiosynthese und das Muskellzellwachstum zu erreichen und die Muskelreparatur und -regeneration nach Verletzungen oder intensiven Trainingseinheiten zu beschleunigen [8, 10].

Allerdings kann eine übermäßige Aktivierung von mTOR diverse Krankheiten verursachen, einschließlich Diabetes und verschiedene Krebsarten [8].

### 2.2.1 Biochemie von mTOR

mTOR liegt als ein Proteinkomplex vor, der sich in zwei Teile untergliedern lässt, die sich deutlich in ihrer Funktion und Struktur voneinander unterscheiden.

mTOR-Komplex 1 (mTORC1) besteht aus:

- mTOR, das Kernprotein des Komplexes.
- Raptor (regulatory associated protein of TOR), ein Protein, das mTOR in mTORC1 rekrutiert und die Bindung von mTORC1 an seine Substrate vermittelt.
- mLST8 (mammalian Lethal with Sec13 protein 8 bzw. auch bekannt als GβL (G protein beta subunit-like)) ist jener Komplex, der von Rapamycin gehemmt werden kann
- PRAS40 (the proline-rich Akt substrate of 40kDa), das an mTOR bindet.
- DEPTOR (DEP domain-containing mTOR-interacting protein): Ein natürliches mTOR-Inhibitorprotein, das sowohl an mTORC1 als auch an mTORC2 binden kann

mTOR-Komplex 2 (mTORC2) besteht aus:

- mTOR, das Kernprotein des Komplexes.
- Rictor (rapamycin-insensitive companion of TOR): es ersetzt Raptor in mTORC2 und ist wichtig für die Stabilität und Funktion des mTORC2-Komplexes
- mLST8, es bindet, wie in mTORC1, an die Kinasedomäne von mTOR
- SIN1 (stress-activated MAP kinase interacting protein 1), ein wichtiges Protein für die Integrität von mTORC2
- DEPTOR, bindet ebenfalls an mTORC2, wie es bei mTORC1 der Fall ist

Im Gegensatz zu Raptor aus dem mTOR1-Komplex lässt sich Rictor nicht durch Rapamycin hemmen. Neuere Studien zeigen jedoch sowohl in vivo als in vitro, dass sich der Rictor Komplex auch durch dauerhafte Rapamycin-Aussetzung hemmen lässt [1].

Der mTOR2-Komplex hat andere physiologische Aufgaben als der mTOR1-Komplex.

Neben den Aufgaben der Regulierung der Zellproliferation und der Differenzierung, ist der mTOR2-Komplex zusätzlich zuständig für die Migration und Zytoskelett-Reorganisation [1].

Die immunsuppressive Wirkung von Rapamycin wird heute zur Vorbeugung einer Organabstoßung nach Organtransplantationen verwendet. Es gibt einige Studien, die Rapamycin auch in anderen Situationen untersuchen [11–13].

### **2.2.2 Aktivierung von mTOR**

mTOR lässt sich durch zahlreiche Faktoren aktivieren.

Dazu gehören vor allem Aminosäuren, zu denen neben den BCAAs auch Arginin, Glutamin und Prolin gehören [1].

Im Wesentlichen gibt es fünf Hauptwege, die mTORC1 aktivieren: Wachstumsfaktoren wie Insulin, IGF-1 [14], EGF [15]; ausreichende zelluläre Energie (Glukose, ATP); die Verfügbarkeit von Aminosäuren, vor allem von essenziellen BCAAs wie Leucin; das Vorhandensein von Glutamin für die zelluläre Leucinaufnahme und die durch Glutaminolyse vermittelte Aktivierung von mTORC1 und die Verfügbarkeit von gesättigten Fettsäuren, insbesondere Palmitinsäure [14].

Von den drei BCAAs übt Leucin die stärkste Wirkung auf die mTOR-Aktivierung und die Steigerung der Proteinsynthese in verschiedenen Geweben, einschließlich der Skelettmuskulatur, aus [10].

### **2.2.3 Der Einfluss von BCAAs auf mTOR unter physiologischen Bedingungen**

Aminosäuren sind für die Aktivierung von mTOR erforderlich, um die Proteintranslation, Zellgröße und Autophagie zu regulieren [16].

Die Wirkung von BCAAs auf mTOR wird überwiegend durch Leucin vermittelt [17]. Leucin ist dafür bekannt, dass es den mTORC1-Signalweg in verschiedenen Zelltypen aktiviert [18, 19], was zur direkten Stimulierung der Proteinsynthese und

der Phosphorylierung von Translationsinitiationsfaktoren und ribosomalen Proteinen führt [20, 21].

Neben den BCAAs können auch ihre Metaboliten, die BCKAs, die mTOR Signalübertragung in verschiedenen Zelltypen verstärken [22].

Die Hauptregulation der Aufnahme von Leucin in die Zelle wird durch LAT1 (L-type amino acid transporters, 4F2hc (auch bekannt als SLC7A5-SLC3A2)) geregelt [23].

Der Aminosäuretransporter LAT1 ist ein Aminosäure-Antiporter, der den Einstrom von diesen Aminosäuren in die Zellen im Austausch gegen den Ausstrom von intrazellulären Substraten (EAA oder Glutamin) vermittelt [24].

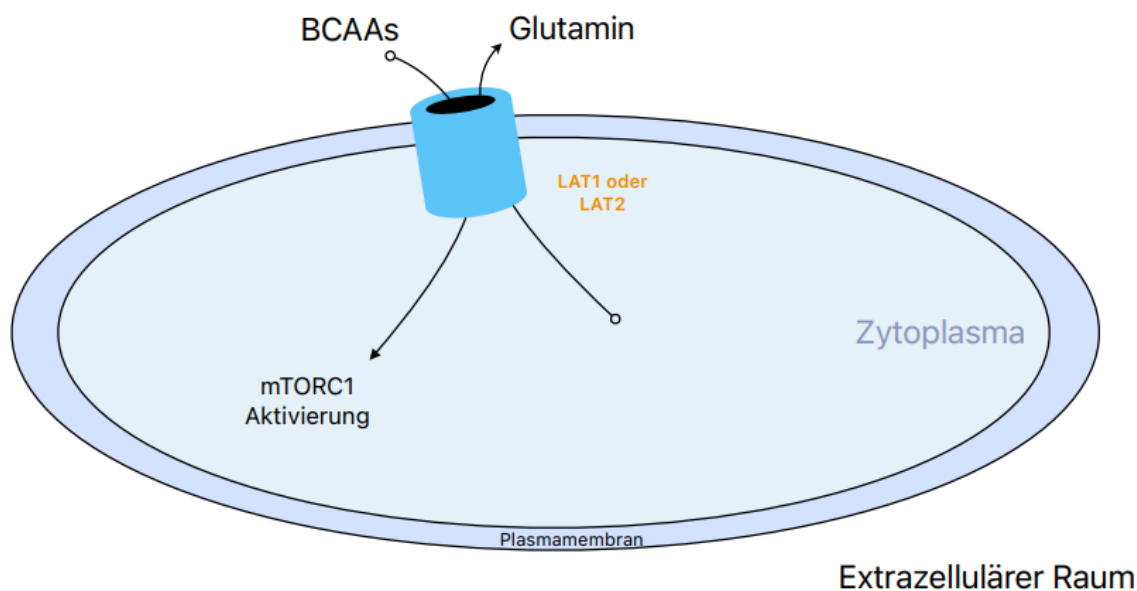


Abbildung 2: Stark vereinfachte Darstellung des Aminosäuretransporters LAT1/2. Modifiziert nach: [24].

Bis heute wurden vier Aminosäuretransporter des Systems L, einschließlich des klonierten LAT4, auf molekularer Ebene identifiziert; über ihren Proteincharakter und ihre funktionellen Eigenschaften in vivo ist jedoch noch wenig bekannt. LAT3 könnte als Aminosäuretransporter fungieren der verzweigt-kettige Aminosäuren aus der Leber und dem Skelettmuskel in den Blutkreislauf transportiert und damit am Regulierungssystem der interorganischen Aminosäureernährung beteiligt ist.

Die Bedeutung der Existenz von LAT3 in der Bauspeicheldrüse ist jedoch unbekannt [25].

Es wurden verschiedene Leucin-Sensoren wie Sestrin, Leucyl-tRNA-Synthetase (LRS) und Glutamat-Dehydrogenase (GLUD1) gefunden, die die intrazelluläre Leucin-Verfügbarkeit an mTORC weiterleiten [26, 27].

Neuere Studien haben zudem gezeigt, dass die Leucin-Signalisierung an mTORC1 in einigen Zelllinien und Primärzellen nicht unbedingt einen Sensor erfordert, da Acetyl-CoA mTORC1 über Raptor-Acetylierung positiv reguliert.

Folglich ist es abhängig vom Zelltyp, ob Leucin direkt oder über seinen Metaboliten Acetyl-CoA mTORC1 aktivieren kann [28].

Sestrin hemmt spezifisch mTORC1 durch Hemmung von Rheb und RagA/B, den beiden GTPasen, die für die mTORC1-Aktivierung wesentlich sind. Der AMPK-TSC2-Weg vermittelt die Wirkung von Sestrin auf Rheb, während die GATOR1-GATOR2-Komplexe für die Auswirkungen von Sestrin auf RagA/B verantwortlich sind [29].



Abbildung 3a: Vereinfachte Darstellung der Sestrin-vermittelten Regulierung von mTORC1 unter ungestressten Bedingungen. Modifiziert nach [29]:

Unter ungestressten Bedingungen ist die Sestrin-Expression und -Aktivität gering. GATOR1 und GATOR2 bilden einen Superkomplex. mTORC1 ist vollständig aktiviert; aktiviertes RagA/B:RagC/D lokalisiert mTORC1 an der lysosomalen Membran und GTP-geladenes Rheb aktiviert die mTORC1 Kinase-Aktivität. Bei BCAA- bzw. Leucinstimulation dissoziiert SESTRIN2 von GATOR2, was zu einer verstärkten mTORC1-Aktivierung führt.

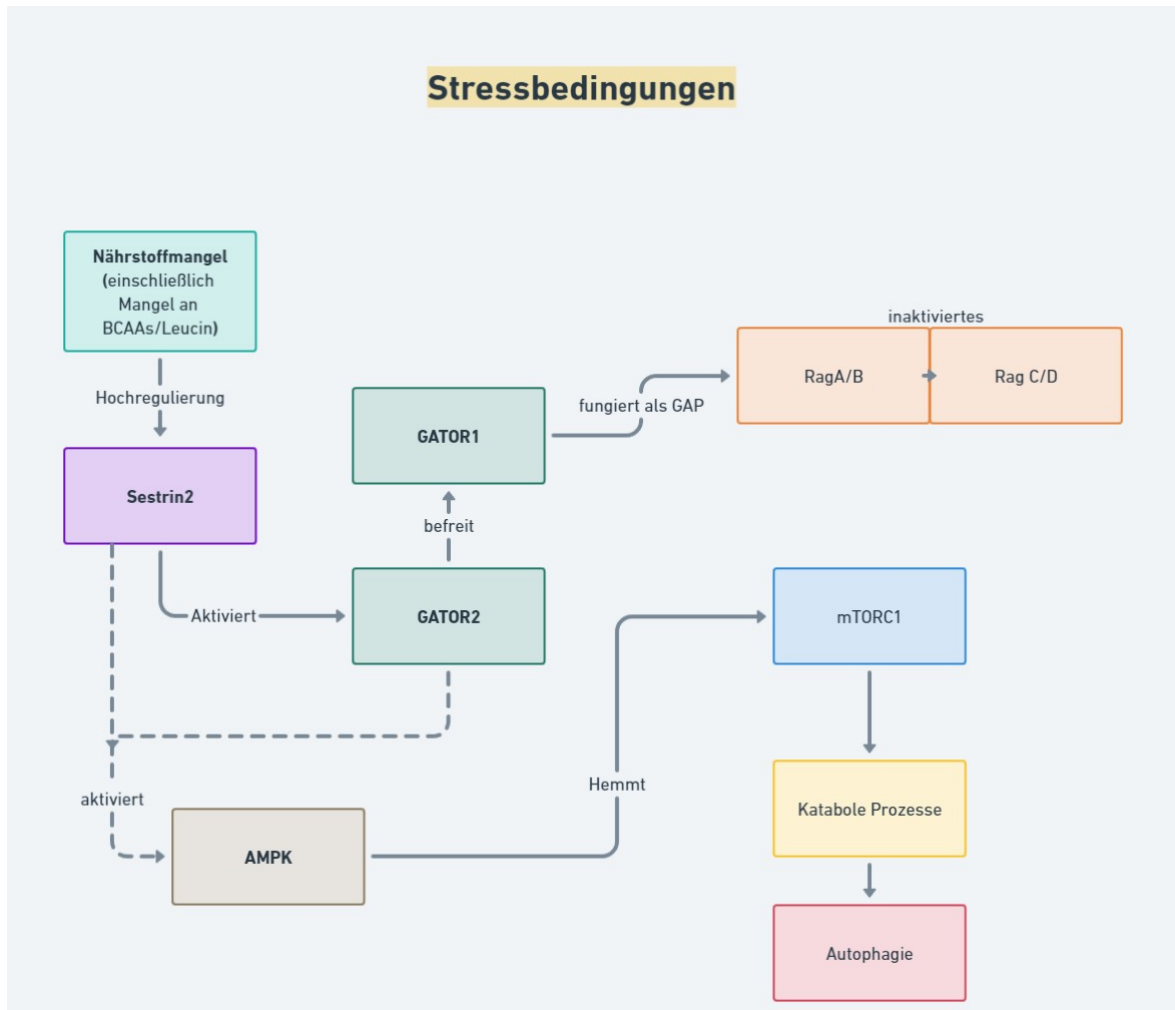


Abbildung 3b: Vereinfachte Darstellung der Sestrin-vermittelten Regulierung von mTORC1 unter Stressbedingungen. Modifiziert nach [29]:

Bei zellulärem Stress oder Nährstoffmangel (einschließlich Mangel an BCAAs bzw. Leucin) werden Sestrine hochreguliert. Dies führt zur Hemmung des mTORC1-Signalwegs, was den anabolen Prozessen entgegenwirkt und katabole Prozesse, wie die Autophagie, fördert. Nach der Hochregulierung von Sestrin bindet es an GATOR2. Dadurch wird GATOR1 von der GATOR2-Hemmung befreit. GATOR1

fungiert anschließend als GAP für RagA/B. Das inaktivierte RagA/B bzw. RagC/D kann dann mTORC1 nicht an das Lysosom lokalisieren und mTORC1 verteilt sich im Zytosol. Zudem fördert die Interaktion von Sestrin mit GATOR2 auch die AMPK-Aktivierung durch bisher unklare biochemische Mechanismen. Die aktivierte AMPK phosphoryliert dann TSC2, eine GAP für Rheb, wodurch Rheb jetzt in seiner inaktiven GDP-beladenen Form vorliegt. AMPK phosphoryliert auch Raptor und diese Phosphorylierung hemmt die mTORC1-Aktivität [29].

mTORC1 wird stark von Sestrin gehemmt, jedoch aktiviert es mTORC2 über mehrere unabhängige Mechanismen [29].

LRS, eine Aminoacyl-tRNA-Synthetase, spielt eine wichtige Rolle bei der Aminosäure-induzierten mTORC1-Aktivierung, indem sie die intrazelluläre Leucin-Konzentration erkennt und molekulare Ereignisse einleitet, um so als GTP-aktivierendes Protein (GAP) für RagD zu fungieren und die Leucylierung von RagA/B sicherzustellen.

Ob die LRS-Spiegel durch den Stoffwechsel gesteuert werden, ist jedoch nicht klar. In der Literatur ist der Beitrag von LRS und SESTRIN zum Leucin-Sensing in vitro ausführlich dargestellt. Neben ihrer Sensortätigkeit ist es plausibel, dass Veränderungen im Proteingehalt der Leucinsensoren eine zusätzliche Kontrolle über die mTORC1-Aktivität ausüben können [30].

## 2.2.4 Signalweg von mTOR

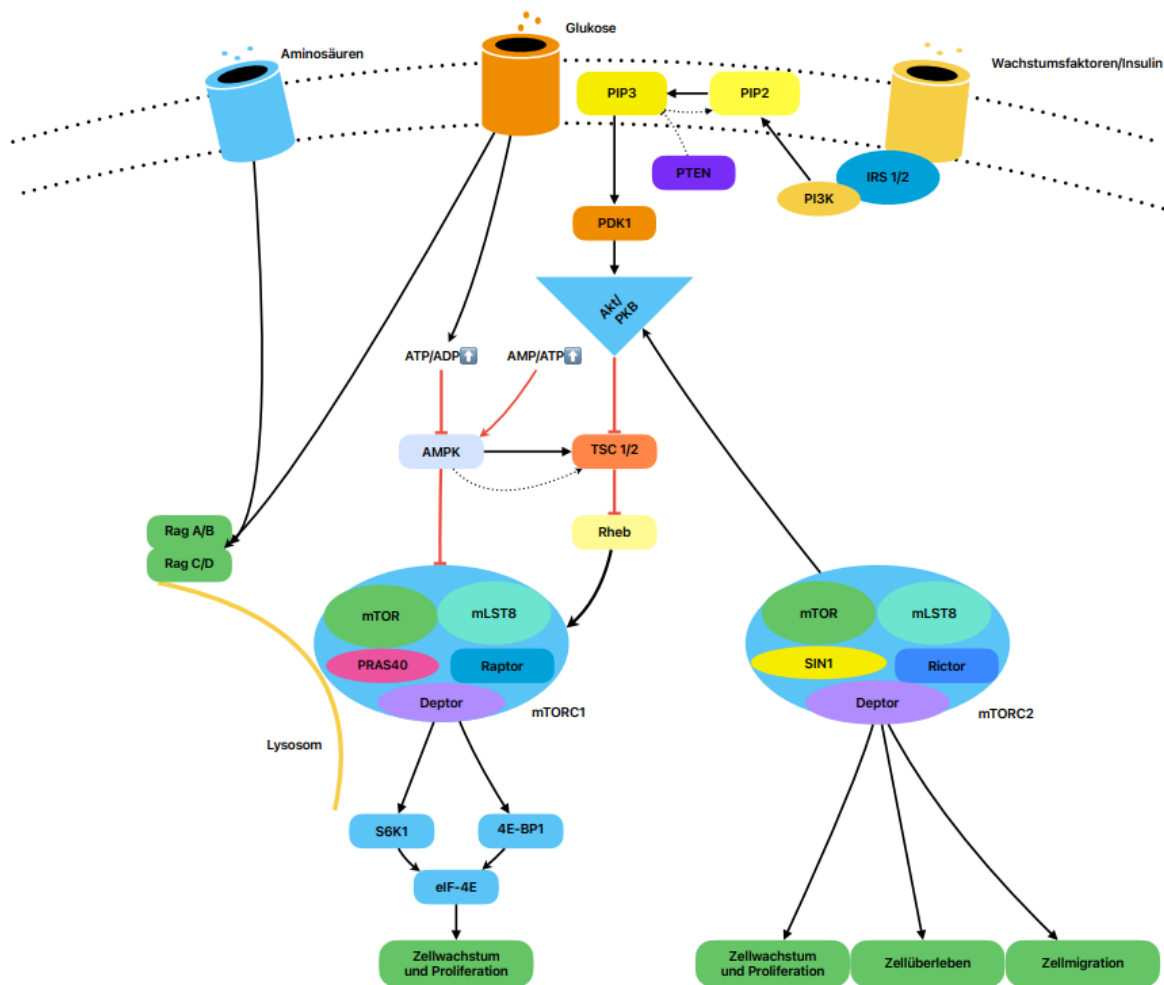


Abbildung 4: MTOR-Signalweg. Modifiziert nach: [15, 31, 32].

Während Wachstumsfaktoren und Insulin mTORC1 über die PI3K-AKT-TSC-Rheb-Signalachse regulieren, funktionieren Nährstoffe wie Aminosäuren über die Rag-Familie von GTPasen [33]. Die wachstumsfaktor- oder insulinabhängige AKT-Aktivierung über PI3K-Signalisierung stimuliert die GTPase Rheb durch Hemmung des Tuberosen-Sklerose-Protein-Komplexes (TSC), der aus den Untereinheiten TSC1, TSC2 und TBC1D7 besteht, die als GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) für Rheb fungieren [31].

Im Fall von Insulin führt die Bindung von Insulin oder insulinähnlichen Wachstumsfaktoren (IGFs) an ihre Rezeptoren zur Rekrutierung und

Phosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrats (IRS) und zur anschließenden Rekrutierung von PI3K.

Die an IRS gebundene PI3K wandelt Phosphatidylinositol-4,5-Phosphat (PIP<sub>2</sub>) in der Zellmembran in Phosphatidylinositol-3,4,5-Phosphat (PIP<sub>3</sub>) um. Die Akkumulation von PIP<sub>3</sub> wird durch die Lipidphosphatase PTEN antagonisiert. PTEN ist eine Phosphatase, die PIP<sub>3</sub> wieder zu PIP<sub>2</sub> dephosphoryliert. PIP<sub>3</sub> rekrutiert PDK1 und AKT (auch als Proteinkinase B bekannt) an der Membran. Dieser Prozess führt zur Phosphorylierung und Aktivierung von AKT durch PDK1.

AKT aktiviert dann mTORC1 über eine Kaskade von nachgeschalteten Zwischenstufen.

MTOR ist über die Tuberöse-Sklerose-Proteine TSC1 (Hamartin) und TSC2 (Tuberin) mit dem PI3K-Signalweg verbunden. TSC1 und TSC2 bilden ein Heterodimer, das die mTOR-Signalübertragung negativ reguliert.

TSC2 wird von AKT als Reaktion auf Insulin phosphoryliert und funktionell inaktiviert. Die Bedeutung der TSC2-Phosphorylierung durch AKT kann jedoch, je nach physiologischem Kontext, variieren [34].

Rheb ist eine GTPase der RAS-Familie, die nun mTOR direkt aktiviert. TSC2 hat eine GTPase-aktivierende Proteinaktivität, die die Rheb-Aktivität hemmt, während TSC1 an TSC2 bindet und für dessen Funktion notwendig ist [15].

Rag-Proteine sind kleine GTP-bindende Proteine, die mit RAS verwandt sind und von denen vier bei Säugetieren vorkommen: RagA, RagB, RagC und RagD. Sie bilden Heterodimere, bestehend aus RagA oder RagB mit RagC oder RagD, wobei nur Rag-GTPase essentiell für die Leucin- und Arginin-vermittelte mTOR-Aktivierung sind [35].

An der Aminosäure-abhängigen Aktivierung von mTORC1 sind die lysosomalen Rag-GTPasen und die Rekrutierung von mTORC1 an die lysosomale Membran beteiligt, um mTORC1 zu stimulieren [33]. Die glukoseabhängige mTORC1-

Aktivierung wird teilweise durch Rag-GTPasen reguliert, wodurch Rag zu einem "Multi-Input-Nährstoffsensor", der Nährstoffinputs wie Aminosäuren und Glukose in eine nachgeschaltete mTORC1-Aktivierung umwandelt, wird [36].

Sobald mTORC1 aktiviert ist, phosphoryliert es p70S6K (S6K1; früher p70 ribosomale S6-Kinase genannt) und 4EBP (das eIF4E-bindende Protein 1 (4E-BP1), setzt dadurch den Initiationsfaktor eIF-4E frei, der an die 5'-Kappe von mRNAs bindet, was zur Translation von mRNAs und zur Synthese von Proteinen führt, die für das Zellwachstum und die Zellzyklusprogression notwendig sind [15].

In Säugetierzellen führt der Entzug von Aminosäuren zur Dephosphorylierung von S6K1 und 4E-BP1 und zu verminderten Proteinsyntheseraten [37].

AKT wird nicht nur von der 3-Phosphoinositid-abhängigen Kinase-1 phosphoryliert, sondern kann auch von mTORC2 phosphoryliert werden.

Die Phosphorylierung von AKT durch mTORC2 ist jedoch nicht für die Aktivierung von mTORC1 notwendig, sondern vielmehr dafür, dass AKT eine bestimmte Untergruppe von nachgeschalteten Zielen phosphoryliert, die das Zellüberleben fördern [15].

mTORC1 erfasst den Energiestatus einer Zelle über die AMPK. AMPK ist ein Hauptsensor für den zellulären Energiestatus und ein starker Inhibitor der mTORC1-Aktivität. AMPK hemmt mTOR durch Phosphorylierung und Aktivierung von TSC2, was zur Hemmung der mTORC1-Signalübertragung führt [38].

AMPK wird als Reaktion auf niedrige zelluläre Energie bzw. Zellstress (hohes AMP/ATP-Verhältnis) aktiviert. Wenn die Zelle ausreichend Energie hat (also mehr ATP als ADP), wird das Enzym AMPK ausgeschaltet. Das hat zwei Effekte: Erstens wird das Protein TSC2 nicht mehr aktiviert, und zweitens wird mTORC1 nicht mehr direkt ausgeschaltet. Weil TSC2 nicht aktiv ist, kann es das Rheb nicht mehr hemmen. Rheb wird also aktiv und schaltet seinerseits mTORC1 ein. Das Endergebnis ist, dass mTORC1 aktiv wird.

[39, 40]. Aktiviertes AMPK reguliert energetisch anspruchsvolle Prozesse wie die Proteinsynthese und stimuliert ATP-erzeugende Prozesse wie die Fettsäureoxidation [34].

4E-BP1 ist ein Translationsinhibitor, der als Reaktion auf ein Wachstumssignal phosphoryliert und inaktiviert wird. Phosphoryliertes 4E-BP1 dissoziiert von eIF4E, dem Translationsinitiationsfaktor, der die Cap-Struktur (m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')N) an den 5'-Termini von mRNAs bindet und dadurch die Cap-abhängige Translation ermöglicht. MTOR phosphoryliert 4E-BP1 nachweislich direkt [41].

## 2.3 Diabetes

Typ-2-Diabetes Mellitus (T2DM) ist eine chronische Krankheit, die ein globales Gesundheitsproblem und eine der häufigsten Todesursachen der Welt darstellt. Die aktuellen Prognosen der International Diabetic Federations (IDF) gehen davon aus, dass die Zahl der Diabetiker bis 2045 auf 629 Millionen ansteigen wird und ca. 34 Millionen Menschen mehr als vergleichsweise 2015 von einer Diabeteserkrankung bedroht sein werden.

Der rasche Anstieg der weltweiten T2DM-Prävalenz wird mit einem westlichen, adipösen Lebensstil in Verbindung gebracht [42].

Es handelt sich um die häufigste Form von Diabetes, die in der Regel im Erwachsenenalter auftritt und durch eine Insulinresistenz (IR), begleitet von einer kompensatorischen Hyperinsulinämie und einem allmählichen Versagen der  $\beta$ -Zellen der Pankreasinseln, gekennzeichnet ist. Aufgrund der Hyperglykämie und der IR haben Personen mit T2DM ein hohes Risiko für mikrovaskuläre Komplikationen (einschließlich Neuropathie, Retinopathie und Nephropathie) und makrovaskuläre Komplikationen (wie Schlaganfall und Herzinfarkt).

T2DM ist nicht nur durch Glukoseintoleranz gekennzeichnet, sondern auch durch eine Dysregulation des Proteinstoffwechsels, die aus einer gestörten Insulinsekretion und/oder IR resultiert. Bei Energiemangel stellen Proteine eine alternative Energiequelle dar. Ein Mangel an Insulin (dem Schlüsselhormon des Glukosestoffwechsels) führt zu erhöhter Glukoneogenese, Glykogenolyse und Proteinabbau in der Skelettmuskulatur. Insbesondere bei IR ist die Proteolyse erhöht, während die Proteinsynthese verringert ist. Erhöhte Konzentrationen von Plasmaamino säuren werden derzeit als Vorhersage des T2DM-Risikos vorgeschlagen. Damit könnte die Erstellung von Aminosäureprofilen zu einem besseren Verständnis der mit T2DM zusammenhängenden Stoffwechselwege

beitragen [43]. Daher könnte die Auswertung des Aminosäureprofils für eine frühzeitige Bewertung des T2DM-Risikos von Nutzen sein. Die Analyse von Metaboliten, insbesondere von Aminosäuren in Körperflüssigkeiten ist ein entscheidender Bestandteil der Diagnose, der Prognose und der Bewertung therapeutischer Maßnahmen in der klinischen Anwendung [44].

Derzeit werden Routinetests für T2DM in der Regel durch die Messung des Nüchtern-Plasmaglukosespiegels oder des Hämoglobin A1c (HbA1c) durchgeführt. In vielen Fällen gelingt es diesen beiden Testverfahren jedoch nicht, einen frühen T2DM zu erkennen, der auch als Prädiabetes bezeichnet wird. Letztlich ist die frühzeitige Identifizierung von Personen mit T2DM-Risiko für die Aufklärung der molekularen Ätiologie und für die Verzögerung der T2DM-Manifestation durch Lebensstil und pharmakologische Interventionen erforderlich [45].

Zu den Risikofaktoren für Typ-2-Diabetes gehören übermäßige Kalorienzufuhr, zentrale Adipositas mit erhöhtem Verhältnis von Taille zu Hüfte, Bewegungsmangel, zunehmendes Alter und mehrere genetische Faktoren [46]. Adipositas verändert den Stoffwechsel und die Physiologie mit der Konsequenz einer Dyslipidämie, IR und Entzündungen und ist daher ein anerkannter und wichtiger Risikofaktor für die Entstehung des Typ-2-Diabetes [47].

Das metabolische Syndrom wird als Vorstufe des T2DM angesehen und ist definiert durch stammbetonte Adipositas mit zusätzlich zwei der vier folgenden Faktoren: erhöhte Triglyceride, erhöhter Nüchternblutzucker oder T2DM, erniedrigtes HDL-Cholesterin und/oder erhöhten Blutdruck.

Konzeptionell können Personen anhand ihrer Reaktion auf eine orale Glukosebelastung als "insulinempfindlich" oder "insulinresistent" eingestuft werden [48]; d.h. wie gut eine Glukosebelastung die Insulinausschüttung der Bauchspeicheldrüse und die Aufnahme von Glukose in das periphere Gewebe anregt [49]. Während insulinempfindliche Personen eine normale Insulinsekretion und eine rasche Glukoseausscheidung aufweisen, zeigen insulinresistente Personen ein gewisses Maß an kompensatorischer Hyperinsulinämie, um die Glukoseaufnahme in das periphere Gewebe zu beschleunigen.

Diabetes entsteht, wenn die  $\beta$ -Zellen nicht weiter kompensieren können, um eine Euglykämie aufrechtzuerhalten. Es ist jedoch wichtig, eine Person nicht einfach als

vollständig insulinempfindlich oder vollständig insulinresistent einzustufen. Die Insulinsensitivität verläuft vielmehr fließend und wird durch eine Vielzahl von Faktoren modifiziert [50, 51]. Darüber hinaus sind verschiedene Zellen und Gewebe unterschiedlich empfindlich gegenüber Insulin [52–54].

Es gibt zahlreiche Studien, die einen Verbindung zwischen BCAAs und einer IR bzw. T2DM untersucht haben. Insbesondere die BCAAs als Prämarker für eine später auftretende IR und in weiterer Folge T2DM wurde in den letzten Jahren intensiv erforscht.

### **2.3.1 BCAAs und der Zusammenhang zwischen IR und Diabetes Mellitus Typ 2**

Bereits 1970 haben Philip Felig et. al bei den Studienteilnehmer\*innen, welche an Diabetes litten, eine zwei- bis dreifach erhöhte Blutkonzentration an Leucin, Isoleucin und Valin festgestellt [55].

In einer anderen Studie aus dem Jahre 1978 haben die erhobenen Daten eine Beziehung zwischen der Konzentration von BCAAs und Insulin im Serum festgestellt. Es wurde angenommen, dass die erhöhten BCAA-Spiegel ein Indikator für die Insulin-abhängige Veränderung des Proteinmetabolismus sind [56].

Neuere Studien haben ebenfalls gezeigt, dass die BCAA-Spiegel im Serum bei Diabetikern erhöht sind [57].

Andere Studien haben den Zusammenhang mit Fettleibigkeit und T2DM untersucht. Es ist allgemein bekannt, dass Fettleibigkeit mit einem erhöhten Risiko von T2DM einhergeht. In einigen Studien hat sich ein stark positiver Zusammenhang von zirkulierenden BCAAs mit Adipositas [57–60] und T2DM [61] gezeigt.

Fettleibigkeitsbedingte Begleiterkrankungen wie T2DM, hoher Cholesterinspiegel und Bluthochdruck traten bei höheren BCAA-Werten häufiger auf [62].

Die BCAA-Aufnahme durch die Nahrung und ihre Beziehung zu den peripheren BCAA-Spiegeln im Blut wurden ausführlich untersucht.

Die peripheren BCAA-Spiegel sind möglicherweise nicht direkt abhängig von den durch die Nahrung aufgenommenen BCAAs.

Obwohl fettleibige Menschen erhöhte BCAA-Werte im Plasma zeigen, könnten diese erhöhten Werte nicht ausschließlich durch eine gesteigerte

Nahrungsaufnahme verursacht worden sein, da solche hohen Werte auch nach einer nächtlichen Fastenkur festgestellt wurden [63, 64].

In der Weight Loss Maintenance (WLM)-Studie wurde festgestellt, dass die BCAA-Aufnahme nur schwach mit den peripheren Blutspiegeln korreliert. Zudem zeigte die Untersuchung, dass eine Änderung der BCAA-Aufnahme über einen Zeitraum von 6 Monaten keinen signifikanten Einfluss auf die Änderung des BCAA-Blutspiegels hatte [65].

Dennoch kann die Ernährung, insbesondere die Supplementierung von BCAAs in einer fettreichen Diät, zu erhöhten BCAA-Werten im Blut und den dazugehörigen Metaboliten führen, wie eine Studie an Ratten zeigte [43]. Daraus ergibt sich, dass die Ernährung weiterhin ein potenziell relevanter Faktor für erhöhte BCAA-Werte bei insulinresistenten Personen ist. Zusätzlich zeigten andere Untersuchungen an asiatisch-indischen und chinesischen Männern, aus einer großen Querschnittsstudie in Singapur, dass insulinresistente Personen trotz vergleichbarer Proteinaufnahme höhere BCAA-Werte aufweisen als insulinsensitive Individuen mit einem durchschnittlichen BMI (Body Mass Index) von  $24 \text{ kg/m}^2$  [66]. Eine Längsschnittstudie der Framingham-Kohorte ergab, dass Diabetiker trotz gleicher Proteinaufnahme höhere BCAA-Spiegel hatten [43]. Eine separate Fall-Kontroll-Studie bestätigte ebenfalls, dass fettleibige und insulinresistente Probanden höhere BCAA-Werte aufwiesen, wobei in dieser Gruppe die erhöhten Werte mit einer gesteigerten Proteinaufnahme assoziiert waren [57].

Dies könnte auf biologische/genetische Unterschiede bei der Verarbeitung von BCAAs hindeuten. Obwohl der BCAA-Plasmaspiegel durch die Ernährung beeinflusst werden kann - insbesondere durch die Proteinzufuhr - zeigen nicht alle Studien einen direkten Zusammenhang zwischen verzehrten BCAAs und BCAA-Spiegeln im Blut [67]. Die Art des konsumierten Proteins, sei es aus tierischen oder pflanzlichen Quellen, kann hierbei eine wichtige Rolle spielen [68]. In Ländern mit hohem Konsum von Fleisch und Milchprodukten, wie z. B. den USA [69] und dem Vereinigten Königreich [70], gibt es einen Zusammenhang zwischen hohen BCAA-Spiegeln und IR. Im Gegensatz dazu wurde in Japan, wo hauptsächlich Getreide

und Fisch verzehrt werden, ein geringeres Risiko für Typ-2-Diabetes bei Frauen festgestellt, die mehr BCAAs konsumieren [71].

Es wurden auch geschlechtsspezifische Unterschiede im Stoffwechsel von Aminosäuren festgestellt. Während die absoluten Konzentrationen der BCAAs bei Männern signifikant höher waren, wurde bei beiden Geschlechtern eine ähnliche Bandbreite der IR beobachtet [72]. In einer anderen Studie von Würtz et al. wurde gezeigt, dass der Zusammenhang zwischen BCAAs und IR bei jungen Frauen nur dann signifikant ist, wenn sie fettleibig sind [73]; obwohl in prospektiven Analysen keine derartige Adipositas-Interaktion gefunden wurde [72].

Eine Studie von Fiehn et al. untersuchte die Unterschiede in den Plasmakonzentrationen von >350 Metaboliten, darunter auch BCAAs, bei nüchternen fettleibigen Frauen mit T2DM im Vergleich zu fettleibigen nicht-diabetischen afroamerikanischen Frauen. Bei T2DM Patientinnen waren bestimmte Aminosäuren und ihre Derivate (Leucin, 2-Keto-Caproat, Valin) und 2-Hydroxybutanoat signifikant erhöht. Die Leucin- und Valinkonzentrationen stiegen mit zunehmendem HbA1c-Wert. Von den Metaboliten, die sich bei T2DM-Probanden unterschieden, war die Plasmaleucinkonzentration um circa 50% signifikant erhöht und ihr anfänglicher katabolischer Metabolit, 2-Keto-Caproinsäure (alpha-Keto-Caproat), war um circa 27% signifikant erhöht. Die mittlere Plasmavalin-Konzentration war bei Typ-2-Diabetikerinnen im Vergleich zu Nicht-Diabetikerinnen um circa 20% höher, aber dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant [74].

Zhang et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen Diabetes und BCAAs bei europäischen Probanden unterschiedlicher ethnischer Herkunft. Bei prädiabetischen Probanden europäischer Herkunft korrelierten steigende HbA1c-Konzentrationen mit ansteigenden BCAA-Konzentrationen. Dies galt für beide Geschlechter. Bei Diabetikern europäischer Herkunft war dieser Zusammenhang ebenfalls zu erkennen, allerdings schwächer. Bei prädiabetischen Frauen afrikanisch-surinamischer und ghanaischer Herkunft wurde ein ähnlicher Zusammenhang zwischen HbA1c und bestimmten BCAAs festgestellt. Bei

diabetischen Frauen afrikanisch-surinamischer Herkunft blieb die Assoziation zwischen Isoleucin, Valin und HbA1c bestehen. Die Abschwächung des Zusammenhangs bei Diabetikern europäischer Herkunft könnte durch Medikamente oder Lebensstiländerungen beeinflusst worden sein [75].

Studien zeigen auf, dass Schwankungen der BCAA-Nüchternwerte im Zustand von Fettleibigkeit und IR größtenteils auf die unterschiedliche Rate der Entstehung und Ausscheidung dieser Metaboliten zurückgehen, verbunden mit einer abnehmenden Aktivität kataboler Enzyme in bestimmten Geweben im Vergleich zu einem insulinempfindlichen Zustand. Es wird angenommen, dass Abweichungen im BCAA-Level die verschiedenen Ausprägungen der IR und T2DM widerspiegeln [76]. Weitere Metabolite des BCAA-Stoffwechsels wurden in anderen Studien thematisiert. So ist zum Beispiel 3-HIB (3-Hydroxyisobutyrat, auch bekannt als 3-Hydroxyisobuttersäure) eine organische Säure und ein Zwischenprodukt im Abbauweg von Leucin, welches schließlich in Acetyl-CoA und Acetoacetat umgewandelt wird, beides Metaboliten die weiter im Energiestoffwechsel genutzt werden können.

Erhöhte Konzentrationen von 3-Hydroxyisobutyrat im Plasma können an bestimmten Stoffwechselstörungen, wie IR und Diabetes beteiligt sein.

In der Studie von Nilsen et al. wurden erhöhte Plasma 3-HIB Konzentrationen, die den Grad der IR widerspiegeln, wobei die höchsten Werte bei manifestiertem Typ-2-Diabetes beobachtet wurden, gefunden. 3-HIB hat stimulierende Effekte auf die Lipidakkumulation in Adipozyten, die Modulation der durch Insulin stimulierten Glukoseaufnahme und unterschiedliche Effekte auf die mitochondriale Atmung [46]. Ein anderer Metabolit, der bei einem gestörten BCAA-Stoffwechsel angehäuft auftritt, die 2-Aminoadipinsäure, führt zu einer Dysfunktion der  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse [76, 77].

Im Fettgewebe von fettleibigen Individuen zeigt sich oft eine verringerte Expression von Genen, die am BCAA-Stoffwechsel beteiligt sind [78–86], wie z. B. die verminderte Expression der mitochondrialen Isoform der verzweigtkettigen Aminosäure Transaminase (BCAT2) und der mitochondriale verzweigtkettige  $\alpha$ -Ketosäure-Dehydrogenase (BCKD) Komplex E1- $\alpha$ . Dies führt zu erhöhten Plasma BCAA-Spiegeln [79, 87].

Daher wurde angenommen, dass eine eingeschränkte BCAA-Verarbeitung im Fett zu erhöhten BCAA-Plasmawerten bei insulinresistenten Personen führen könnte [78, 79, 81, 87]. Jedoch sind die dahinterstehenden Mechanismen noch unklar. Das viszerale Fett könnte hierbei eine zentrale Rolle einnehmen [78]. Passend dazu zeigt die Genexpression von BCAA-abbauenden Enzymen im viszeralen Fett eine starke Korrelation mit der Insulinsensitivität [78, 86]. Es gibt jedoch Einwände gegen diese Theorie, da der BCAA-Metabolismus im ganzen Körper organübergreifende Abhängigkeiten aufweist. Es gibt Beweise aus Studien an Patient\*innen und Mausmodellen mit der Ahornsirupkrankheit. Hier hat die Transplantation von gesundem Gewebe die BCAA-Plasmawerte erheblich reduziert [76]. Bei Menschen mit normalem Stoffwechsel sollte eine hohe BCAA-Aufnahme aufgrund der BCKDC-Reservekapazität und der Aktivierung durch überschüssiges Substrat gut verträglich sein [88]. Ein BCAA-Metabolismus-Verlust in einem Organ könnte durch normale oder gesteigerte Aktivitäten in anderen Organen kompensiert werden, es sei denn, diese zeigen mitochondriale Dysfunktionen, wie sie bei insulinresistenten Adipositas oder T2DM häufig sind [76].

Bei fettleibigen Zucker-Ratten wird eine geringere Aktivität des BCKDC-Enzyms in verschiedenen Geweben wie Fett, Leber und Herz beobachtet, verglichen mit mageren Tieren [79]. Dies steht in Verbindung mit erhöhten BCKA- und Alloisoleucin-Werten [89]. Bei Nagetieren mit durch Ernährung verursachter Fettleibigkeit zeigt sich ein unterschiedliches Bild [78]: Obwohl das Fettgewebe reduzierte BCAA-Enzymwerte aufweist, könnte die Leber diese ausgleichen [90]. Daraus könnte man schließen, dass es auch bei Menschen unterschiedliche BCAA-Stoffwechsellmuster gibt [90].

Ein möglicher Punkt ist jedoch, dass langkettige Fettsäuren und ihre Metaboliten, die bei insulinresistenten Zuständen und T2DM erhöht sind, die BCKDC-Aktivität entweder durch die Beeinflussung von Redoxzuständen oder Acetyl-CoA-Konzentrationen hemmen [76].

Die erhöhte Verfügbarkeit von freien Fettsäuren und ihre Fähigkeit, den BCAA-Stoffwechsel in den Mitochondrien direkt oder indirekt zu hemmen (z. B. mit oxidativem Stress verbundene Carbonylierung), könnte ein Faktor sein, der erhöhte freie Fettsäurespiegel mit dem hier vorgestellten BCAA-Dysmetabolismus-Modell verbindet [81].

Der ganzkörper- und gewebespezifische BCAA-Stoffwechsel bei IR und T2DM birgt Rätsel, insbesondere wenn Personen mit unterschiedlicher Körperstruktur verglichen werden. So haben fettleibige Zucker-Ratten eine etwa doppelt so große Leber wie ihre mageren Artgenossen, wobei die Leber der Fettleibigen zusätzlich lipidbeladen ist. Während die Fettmasse bei fettleibigen Ratten zunimmt, nimmt die Muskelmasse ab [87].

Die Ergebnisse von Francois-Pierre J. Martin et al. unterstützen die Assoziation von BCAA- und Tyrosinspiegeln mit viszeraler Adipositas, unabhängig von ethnischer Zugehörigkeit, Lebensstil und Umweltbedingungen [91].

Untermauert werden die mit der Fettleibigkeit verbundenen erhöhten BCAA-Spiegel dadurch, dass Laferrère et al. [92] und Shah et al. [65] zeigten, dass ein chirurgisch bedingter Gewichtsverlust und Lifestyle-Interventionen, die zu Gewichtsverlust führen, die BCAA-Konzentrationen senken und die Insulinsensitivität verbessern können, wobei Laferrère et al. einen stärkeren Rückgang der BCAA-Konzentrationen nach Magenbypass-Operationen im Vergleich zu reinen Lebensstiländerungen beobachteten.

Im Gegensatz dazu haben Tai et al. gezeigt, dass BCAAs und verwandte Metaboliten mit IR assoziiert sind, selbst wenn kein Übergewicht vorliegt [66]. Dies legt nahe, dass eine Dysregulierung des Aminosäurestoffwechsels ein frühes Ereignis in der Progression zu schwerer IR und Typ-2-Diabetes sein kann [66].

Es wurden andere Mechanismen beschrieben, die einen Zusammenhang zwischen erhöhten BCAA-Spiegeln, Fettleibigkeit und IR bzw. Diabetes festgestellt haben.

BCAAs beeinflussen die Entwicklung von IR und Diabetes durch zusätzliche Mechanismen in peripheren Geweben und durch direkte Wirkungen auf die  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse [93].

Das erhöhte Vorkommen von Glutamat wurde ebenfalls mit Fettleibigkeit und IR in Verbindung gebracht. Es gibt Hinweise darauf, dass chronisch erhöhte Werte von Glutamat und BCAAs die Insulinsekretion erhöhen können [21, 94], was zu Hyperinsulinismus und einem potenziellen Versagen der  $\beta$ -Zellen beitragen könnte.

Glutamat kann auch eine direkte Toxizität für die  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse haben [95].

Newgard et al. interpretieren einen erhöhten Glutamatspiegel bei fettleibigen, insulinresistenten Personen als möglichen Hinweis auf einen erhöhten BCAA-Katabolismus. Der erste Schritt beim Abbau von BCAAs ist ihre reversible Transaminierung, bei der Glutamat und verzweigtkettige Ketosäuren entstehen [57].

Bei fettleibigen im Vergleich zu schlanken Personen kann ursächlich für erhöhte Valin- und Leucin/Isoleucin-Spiegel auch ein erhöhter BCAA-Katabolismus verantwortlich sein, welcher zu einer erhöhten Produktion von Alanin führt. Da Alanin eine stark glukoneogene Aminosäure ist, kann ein erhöhter BCAA-Katabolismus zu einer erhöhten hepatischen Glukoseproduktion beitragen [57]. Darüber hinaus unterdrücken die erhöhten  $\alpha$ -Ketosäuren, die durch den erhöhten BCAA-Katabolismus erzeugt werden, möglicherweise auch die mitochondriale  $\beta$ -Oxidation [96].

Eine andere Arbeit zeigte auch, dass das Darmmikrobiom zu erhöhten BCAA-Spiegeln in insulinresistenten Zuständen beitragen kann [97].

Eine weitere mögliche Erklärung für den Anstieg der BCAAs bei Fettleibigkeit ist ein erhöhter Proteinkatabolismus als Folge der IR. Jensen und Haymond [98] berichteten, dass die Proteolyse bei mäßiger Oberkörperfettleibigkeit erhöht ist und die antiproteolytische Wirkung von Insulin beeinträchtigt ist. Luzi et al. [99] kamen ebenfalls zu dem Schluss, dass die erhöhte Proteolyse bei Fettleibigkeit auf eine beeinträchtigte antiproteolytische Wirkung von Insulin zurückzuführen ist.

Die IGF-I-Spiegel waren bei insulinresistenten Personen reduziert. Dies könnte möglicherweise zu einer verminderten anabolen Nutzung von Aminosäuren, einschließlich BCAAs, für die Proteinsynthese und das Zellwachstum führen, was zu deren Anstieg im Blutkreislauf beiträgt [57, 66].

Die durch Fettleibigkeit und IR verbundene erhöhte Entzündung könnte zu einem beschleunigten Muskelabbau führen [66].

Bei Individuen mit Lebersteatose kann ein Faktor vorliegen, der einen initialen Zustand der IR induziert [100], woraus wiederum ein sekundärer Anstieg von BCAAs und deren Metaboliten resultiert.

### **2.3.2 Andere Mechanismen**

Im Verdauungssystem und im Fettgewebe beeinflussen BCAAs die Ausschüttung von Hormonen wie Leptin, GLP-1 und Ghrelin, welche potenziell die Nahrungsaufnahme und den Blutzuckerspiegel regulieren. BCAAs und Insulin senden Wachstumssignale, die das Wachstum von energieverbrauchenden Geweben beeinflussen. Dies geschieht teils durch ihre Wirkung auf den mTORC1 und die PKC $\epsilon$ , sowie durch die Verminderung des Proteinabbaus [76].

Im Hypothalamus fördert die Insulinreaktion die Aktivität der hepatischen BCKDH. Bei übermäßiger Nahrungsaufnahme nimmt diese Reaktion jedoch ab. Das legt den Schluss nahe, dass eine IR im Hypothalamus den BCAA-Stoffwechsel bei Fettleibigkeit und Diabetes stören könnte [101]. Daher könnten die BCAAs im Blut eher Indikatoren für die Insulinreaktion im Hypothalamus als direkte Treiber für Änderungen in der IR sein [102].

Insulin hat auch eine direkte Wirkung auf den BCAA-Stoffwechsel in der Skelettmuskulatur, indem es die BCAA-Oxidation durch die Regulierung der katabolen Enzyme, BCAA-Aminotransferase und verzweigtkettige Ketosäure-Dehydrogenase verringert [103, 104].

Zirkulierende Aminosäuren können die IR direkt fördern, möglicherweise über eine Störung der Insulinsignalübertragung in der Skelettmuskulatur, indem sie direkt den Glukosetransport und/oder die Phosphorylierung in der Skelettmuskulatur hemmen [43, 105] aber es könnte auch eine verringerte Aufnahme und erhöhte Freisetzung von BCAAs aus der Skelettmuskulatur aufgrund des erhöhten Proteinkatabolismus bei IR vorliegen [86].

Die Ergebnisse von Stančáková et al. deuten darauf hin, dass der Zusammenhang zwischen Insulinsensitivität und Aminosäureabbau (insbesondere BCAA-Abbau) auch auf mRNA-Ebene besteht und liefern weitere Hinweise darauf, dass die

Insulinsensitivität wahrscheinlich zu höheren BCAA-Spiegeln bei Hyperglykämie beiträgt [86].

Ein weiterer Mechanismus der in Betracht kommt, ist die Aktivierung mTORC-1 und S6K1 (ribosomale Protein-S6-Kinase) durch Leucin. Dies führt zu einer Serinphosphorylierung von IRS-1 und IRS-2 und in weiterer Folge zu einer IR [57]. Obwohl einige mögliche kausale Erklärungen für den negativen Einfluss auf die IR vorgebracht werden, ist es wichtig zu betonen, dass BCAAs nicht unbedingt ursächlich für diese Zustände sind oder einen negativen Einfluss haben müssen.

Obwohl es viele Arbeiten dazu gibt, wie BCAAs und deren Katabolismus mit möglichen negativen Folgen auf den Ganzkörpermetabolismus einhergehen, gibt es einige Arbeiten, aus denen sich gegenteilige Thesen herauskristallisiert haben.

So gibt es Stimmen, die die These vertreten, dass die BCAA-Aufnahme oder eine BCAA-reiche bzw. proteinreiche Ernährung die Stoffwechselgesundheit fördern [106–113], einschließlich der Verbesserung der IR durch Leucin [114], der hypoglykämischen Wirkung von Isoleucin [115], der Verbesserung der hepatischen De-novo-Lipogenese und der Verhinderung einer Lebersteatose [116, 117].

Darüber hinaus haben bevölkerungsbezogene Studien über die Aufnahme von BCAAs mit der Nahrung und das Körpergewicht gezeigt, dass eine höhere BCAA-Aufnahme mit einer geringeren Prävalenz von Übergewicht und Adipositas verbunden ist [112]. Des Weiteren wurde in der Studie von Takayama et al. in der japanischen Bevölkerung ein Zusammenhang zwischen einer höheren Aufnahme von BCAAs und einem geringeren Diabetesrisiko festgestellt [71].

Daraus ergibt sich die Annahme, dass durch eine BCAA-Supplementierung oder eine BCAA-reiche Ernährung die metabolische Gesundheit positiv beeinflusst werden könnte [76].

Untermuert wird diese These durch verschiedene Untersuchungen.

Beispielsweise haben einige Untersuchungen bei Ringern und fettleibigen Individuen ergeben, dass die Ergänzung mit BCAAs positive Effekte auf das Körpergewicht und das Körperfett hat [112, 118]. Die International Study of Macro-/Micronutrients and Blood Pressure (INTERMAP) ermöglichte eine umfassende Bewertung der Effekte von Nahrungsmittel-BCAAs in unterschiedlichen Kulturkreisen. Diese Studie zeigte, dass eine gesteigerte BCAA-Zufuhr bei Menschen mittleren Alters aus Ostasien und dem Westen mit einer niedrigeren Rate

an Übergewicht und Fettleibigkeit verbunden ist [112]. In dieser Hinsicht analysierten Solerte et al. in einer randomisierten Studie mit älteren Typ-2-Diabetikern die Effekte einer BCAA-reichen Aminosäurenformel und fanden heraus, dass diese zu einer besseren metabolischen Kontrolle (z. B. niedrigeres HbA1c) und einer erhöhten Insulinsensitivität beitragen [119]. Es ist anzumerken, dass BCAAs effektiv die IR bei Patient\*innen mit chronischen viralen Leberkrankheiten verringern [120] und die positiven gesundheitlichen Effekte einer BCAA-Ergänzung bei Patient\*innen mit Lebererkrankungen, einschließlich derer mit Zirrhose, in verschiedenen Studien dokumentiert worden sind [110, 121, 122].

Die Verabreichung von Leucin an fettleibige Mäuse hatte entweder keine Wirkung [123] oder verbesserte das Stoffwechselprofil erheblich [124]. Schließlich haben proteinreiche Diäten bei Typ-2-Diabetikern und fettleibigen Menschen häufig positive Auswirkungen auf den Stoffwechsel [125, 126].

Mahendran et al. kamen zu dem Schluss, dass höhere BCAA-Spiegel keinen kausalen Effekt auf die IR haben sondern darauf hindeuten, dass die IR höhere zirkulierende BCAA-Spiegel induziert [127].

Zu einem ähnlichen Schluss kamen Würtz et al. [73]. Ihre Ergebnisse lassen daher nicht auf eine ätiologische Rolle von Aminosäuren bei der Krankheitsentstehung schließen. Die Querschnittsassoziationen mit der Ernährung können jedoch möglicherweise durch andere Umweltfaktoren beeinflusst werden.

Um das genauer zu erforschen, wurden genetische Varianten untersucht, die in der Aminosäurenregulation von verzweigt-kettigen und aromatischen Aminosäuren involviert sind. Sie fanden heraus, dass 11 von 12 genetischen Varianten, darunter 6, welche verzweigt-kettige und aromatische Aminosäuren regulieren, nicht mit dem HOMA-IR assoziiert waren [73].

## **2.4 Rolle von mTOR auf die Diabetesentstehung**

Speziell in der  $\beta$ -Zelle spielen mTORC1 und mTORC2 eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der  $\beta$ -Zellmasse, der Insulinsekretion und der Reifung [128].

### **2.4.1 Rolle von mTOR1 auf die Diabetesentstehung**

Der mTORC1 der  $\beta$ -Zellen spielt eine zentrale Rolle bei der Homöostase der  $\beta$ -Zellen, der Insulinsynthese und der Insulinsekretion [129–132].

Zur Aufrechterhaltung einer angemessenen  $\beta$ -Zellmasse und  $\beta$ -Zell-Homöostase ist ein physiologisches Niveau der mTORC1-Signalisierung erforderlich [133].

So stimuliert eine anhaltende Überaktivierung der mTORC1-Signalübertragung die Gewichtszunahme, erhöht die Körpermasse und die Fettmasse [134–139], bekannte Risikofaktoren, die die Entwicklung von T2DM fördern.

Um sich an die erhöhte metabolische Belastung durch Adipositas und IR anzupassen, erhöhen die  $\beta$ -Zellen ihre Masse durch Proliferation, Neogenese und Hypertrophie, um die  $\beta$ -Zellfunktion zu verbessern [133].

Während der Entwicklung von T2DM können  $\beta$ -Zellen in einer anfänglichen Phase funktionelle Anpassungen vornehmen. Allerdings führt eine kontinuierliche Überlastung durch chronische und wachsende IR dazu, dass sie schrittweise ihre regulative Kapazität für die Homöostase verlieren [140]. Eine anhaltende mTORC1-Aktivität in  $\beta$ -Zellen durch genetische Manipulation oder chronischen Nährstoffüberschuss führt schließlich zu einer Dysfunktion der  $\beta$ -Zellen und zu deren Versagen [31].

Hyperglykämie und Hyperlipidämie, die diese Veränderungen begleiten, sind zytotoxisch für die Gesundheit und Funktion der  $\beta$ -Zellen [141], da sie die Aktivitäten der Organellen stören und Signalwege für den programmierten Zelltod aktivieren [128].

Ausreichende Aminosäurekonzentrationen, insbesondere Leucin, sind für das Wachstum von Pankreas- und endokrinen Vorläuferzellen in einer mTOR-abhängigen Weise essenziell, da eine mTORC1-Hemmung zu einer Pankreas-Agenesie mit gehemmter Differenzierung zu azinären und endokrinen Zellen und neonataler Hyperglykämie und Hypoinsulinämie führt [142].

Aus den  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse steigert Leucin die Insulinfreisetzung [129, 143]. Durch eine Überladung mit BCAAs kann eine IR durch die Aktivierung von mTOR verursacht werden (und zu einem Anstieg der Acylcarnitine führen) [57], wobei mTOR in diesem Szenario als ein zentrales Signal zwischen BCAAs und Insulin angesehen wird [144].

Übermäßige Mengen an zirkulierenden BCAAs aktivieren mTORC1 und sein nachgeschaltetes Substrat, die Kinase S6K1, welche das Insulinrezeptorsubstrat 1 (IRS-1) phosphorylieren, wodurch IRS-1 gehemmt wird [14].

IRS-1 ist ein Schlüsselprotein in der Insulinsignalübertragung. Wenn Insulin an seinen Rezeptor auf der Zelloberfläche bindet, wird dieser aktiviert und phosphoryliert IRS-1 an bestimmten Tyrosinresten. Dies initiiert eine Kaskade von intrazellulären Signalereignissen, die letztlich zur Stimulierung des Glukosetransports und anderer metabolischer und mitogenetischer Prozesse führen. Störungen im IRS-1-Signalweg können zur Entwicklung von IR und anderen metabolischen Erkrankungen beitragen.

Dieser Weg macht die IRS unfähig, Glukosetransporter auf die Zelloberfläche zu übertragen, wodurch der Blutzuckerspiegel steigt [145–147].

Folglich kommt es durch die Beeinträchtigung der Bindung des Insulins an seinen Rezeptor, was zum Zustand der IR [67] und schließlich zu T2DM führt [148].

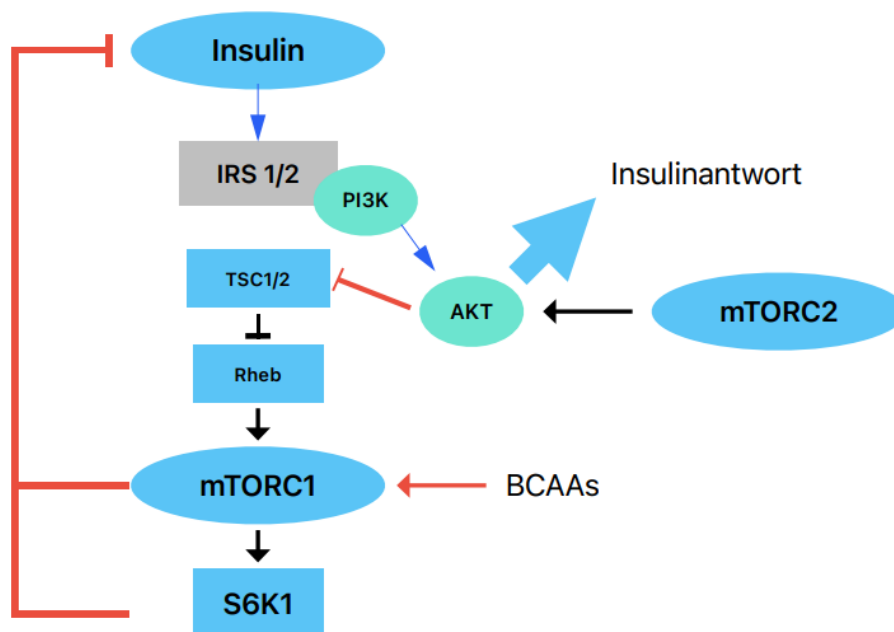


Abbildung 5: Vorgeschlagener Mechanismus: BCAAs induzierte IR durch die Stimulierung von mTORC1. Modifiziert nach: [149].

Insulin löst die Autophosphorylierung des Insulinrezeptors aus, wodurch es zur Rekrutierung und Phosphorylierung von IRS1/2 kommt [150]. Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) der Klasse I dockt an IRS1/2 an, gefolgt von Phosphatidylinositid-3,4,5-P3 (PIP3), das an AKT bindet, was wiederum zur Phosphorylierung von AKT an Threonin in der Aktivierungsschleife durch die phosphatidylinositidabhängige Kinase 1 (PDK1) führt [151, 152]. AKT wird durch mTORC2 phosphoryliert [151]. AKT aktiviert mTOR/S6K1 durch Phosphorylierung von TSC1/2. Insbesondere regulieren hyperaktives S6K1 und mTOR AKT negativ, indem sie die Serinphosphorylierung von IRS-1 induzieren [57, 153–156], wodurch dessen Interaktion mit dem Insulinrezeptor gestört wird und zu dessen Abbau führt.

Eine gestörte Aktivierung von AKT über die negative Rückkopplung dämpft die Insulinreaktionen, wie z.B. die Zunahme der Glukoseaufnahme, der Glykogensynthese und die Abnahme der Glukosesynthese [149].

Neben der Phosphorylierung von Translationsinitiationsfaktoren und ribosomalen Proteinen dient auch AMPK als mögliches Ziel von Leucin und kann einen indirekten Einfluss auf mTOR nehmen [157].

Die glukosestimulierte Insulinsekretion von  $\beta$ -Zellen steht in direktem Zusammenhang mit der Erzeugung von Stoffwechselzwischenprodukten. Daher gilt AMPK als möglicher Kandidat für die Kontrolle der Insulinsekretion und des Insulingehalts [158]. Viele Studien haben berichtet, dass ein hoher Glukose- oder Fettsäuregehalt die Insulinsekretion durch die Kontrolle der AMPK-Aktivität in  $\beta$ -Zellen des Pankreas verändern könnte [159–162].

Frühere Arbeiten [163] berichteten über eine verringerte AMPK-Aktivierung in T2DM-Inselzellen. Ebenso berichten Solimena et al., dass die AMPK- und Insulin/IGF-1-Signalübertragung in den Inselzellen bei Menschen mit T2DM spezifisch beeinträchtigt ist [164].

Neben der direkten BCAA-bedingten chronischen Aktivierung von mTOR und der daraus resultierenden IR, wurde auch ein anderer Mechanismus beschrieben, wie ein durch mTOR hochregulierter ER-Stress zur Apoptose der  $\beta$ -Zellen führt.

Es gibt zahlreiche Belege dafür, dass ER-Stress (Endoplasmatisches Retikulum) bei chronisch überlasteten  $\beta$ -Zellen zu einer frühen  $\beta$ -Zell-Apoptose führt. Studien

am Menschen deuten darauf hin, dass eine Glukoseintoleranz nach einer Verringerung der  $\beta$ -Zellmasse um 20% auftritt, während sich ein Diabetes bei einer Verringerung um 65% entwickelt. Wichtig ist, dass eine erhöhte mTORC1-Signalisierung die ER-Stress-Reaktion hochreguliert. Eine erhöhte mTORC1-Aktivität (aufgrund des Verlustes von TSC-Suppressoren) kann eine Apoptose auslösen. Bei anhaltendem ER-Stress trägt mTORC1 zur apoptotischen Signalgebung bei, indem es AKT durch eine Rückkopplungshemmung unterdrückt. Offenbar stimuliert ER-Stress die Expression von LAT und erhöht dadurch die Leucinspiegel innerhalb der  $\beta$ -Zellen, was die Leucin-mTORC1-Signalisierung verstärkt. Dies wiederum stimuliert die mTORC1-Signalgebung während des ER-Stresses [14].

#### **2.4.2 Die Rolle von mTOR2 bei Diabetesentstehung**

mTORC2 wurde weniger umfassend untersucht als mTORC1, scheint jedoch eine entscheidende Rolle bei der Anpassung der  $\beta$ -Zellen an metabolischen Stress, der  $\beta$ -Zellproliferation, dem Überleben und der glukosestimulierten Insulinsekretion zu spielen [165, 166].

mTORC2 aktiviert die Insulinsignalübertragung, indem es AKT im Anschluss an den Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Insulin-Signalweg phosphoryliert [167].

Mehrere unabhängige Studien haben gezeigt, dass AKT, ein wichtiger nachgeschalteter Effektor von mTORC2, für das Überleben und die Funktion von  $\beta$ -Zellen entscheidend ist [165, 168–170]. Studien an Mäusen mit  $\beta$ -Zell-spezifischer Deletion von Rictor, einer Schlüsselkomponente von mTORC2, geben weitere Einblicke in die Rolle von mTORC2 bei der Regulierung der Insulinsekretion, der  $\beta$ -Zell-Anpassung und der Glukose-Homöostase [165, 171].

mTORC2 ist in menschlichen T2DM-Inseln vermindert [172] zusammen mit beeinträchtigter AKT-Signalisierung, wodurch die  $\beta$ -Zell-Dysfunktion und Apoptose gefördert werden [169, 173]. Eine wichtige Folge der chronischen Aktivierung von mTORC1 ist die Beeinträchtigung der Insulin- sowie der mTORC2-Signalwege. Dies wurde in peripheren Geweben wie Leber und Muskeln (im Zusammenhang mit IR) gut dokumentiert [155, 174–176] und beginnt sich in metabolisch gestressten  $\beta$ -Zellen von Menschen und Nagern zu entwickeln. Ein diabetisches Milieu, wie z. B.

proinflammatorische Zytokine oder andere metabolische Triebkräfte der IR, induziert eine anhaltende Aktivierung von mTORC1; zusammen mit dem Szenario der Hemmung der Insulin- und/oder mTORC2-Signalübertragung kann dies zu einer Potenzierung der  $\beta$ -Zell-Dysfunktion führen [31].

### **2.4.3 BCAAs als Früherkennungsmarker für IR und Diabetes**

Die Früherkennung von IR und Typ-2-Diabetes durch Biomarker bietet erhebliche Vorteile, die das Potenzial haben, die Patient\*innenversorgung zu revolutionieren. Eine rechtzeitige Diagnose ermöglicht nicht nur eine sofortige therapeutische Intervention und Lebensstiländerungen, sondern auch die Vorbeugung schwerwiegender diabetesbedingter Komplikationen. Diese Prävention kann Komplikationen wie Neuropathie und kardiovaskuläre Erkrankungen abwenden. Wirtschaftlich gesehen könnten die langfristigen Gesundheitskosten durch die Vermeidung teurer Behandlungen dieser Komplikationen erheblich reduziert werden.

Mit einem präzisen Verständnis des individuellen Risikos der Patient\*innen könnten Ärzte personalisierte medizinische Versorgungsansätze, die zu effektiveren Therapien führen, entwickeln. In der Forschung könnten solche Biomarker dazu beitragen, Risikopopulationen zu identifizieren und wertvolle Daten für epidemiologische Studien bereitzustellen. Zudem könnten diese Marker das öffentliche Bewusstsein für die Risiken und die Prävention von T2DM erhöhen, was wiederum zu einem besseren Gesundheitsverhalten in der Bevölkerung führen könnte.

Abschließend könnte ein tieferes Verständnis der Mechanismen, die diese Krankheiten auslösen, der pharmakologischen Forschung neue Wege eröffnen und letztlich die Lebensqualität der Betroffenen verbessern.

Biomarker, die die Entwicklung einer Glukoseintoleranz und eines Typ-2-Diabetes vorhersagen können, sind in einigen Studien beschrieben worden [74, 177, 178].

Wang et al. zeigten, dass BCAAs signifikant mit einer zukünftigen Diagnose von T2DM verbunden sind. Die Studie nutzte Daten aus der Framingham-Nachkommen-Studie über einen Zeitraum von 12 Jahren. Diese Arbeit zeigte, dass BCAA- und AAA-Spiegel signifikant mit einer zukünftigen Diagnose von T2DM in Zusammenhang stehen. Die Studie umfasste 2.984 Probanden in der

Kohortenstudie und Probanden ohne T2DM (2.729 Proband\*innen) wurden in der Nachfolgestudie einbezogen [43].

In der Studie von Wang-Sattler et al. [178] konnten vier der fünf verzweigtkettigen und aromatischen Aminosäuren, die zuvor als Prädiktoren für T2DM gemeldet wurden, anhand verschachtelter/ausgewählter Fallkontrollproben von Wang et al. [43] repliziert werden.

Zudem bestätigen die Daten von Floegel et al. die Ergebnisse von Wang et al. [43], die in der Framingham Offspring-Kohorte und in der Malmö Diet und Cancer-Studie auf den Zusammenhang zwischen BCAAs, aromatischen Aminosäuren und T2DM hinwiesen. Ähnlich wie Wang et al. [43] stellten Floegel et al. fest, dass höhere Mengen von Phenylalanin, Isoleucin, Tyrosin und Valin mit einem gesteigerten T2DM-Risiko korrelieren. In ihrer Analyse zeigte sich jedoch, dass, wenn man alle Metaboliten berücksichtigt, lediglich Phenylalanin eigenständig mit dem T2DM-Risiko in Zusammenhang stehen [177]. Ein wesentlicher Vorteil der Untersuchung bestand darin, dass sie wohl zu den Ersten gehörten, die einen fokussierten Metabolomik-Ansatz in einer Bevölkerungsstudie umgesetzt und Daten von drei eigenständigen, detailliert charakterisierten Studiengruppen herangezogen haben [177].

Die Ergebnisse der Studie von Yamakado et al., die 3.701 japanische Proband\*innen umfasste, legen nahe, dass das Profiling von freien Plasma-Aminosäuren (PFAA) verwendet werden kann, um das vierjährige Risiko für die Entwicklung von lebensstilbedingten Erkrankungen, einschließlich Diabetes mellitus, metabolischem Syndrom, Dyslipidämie und Bluthochdruck, in einer allgemeinen japanischen Bevölkerung vorherzusagen. Die Studie fand heraus, dass PFAA-Profile in der Lage waren, das Risiko für die Entwicklung dieser Krankheiten mit hoher Genauigkeit vorherzusagen und dass BCAAs signifikant mit einer zukünftigen Diagnose von Diabetes in Zusammenhang stehen. Die Studie ergab auch, dass diese Modelle auch nach Berücksichtigung allgemein anerkannter multipler Risikofaktoren die zukünftige Entwicklung von Diabetes, metabolischem Syndrom und Dyslipidämie vorhersagen können [179].

Die Studie von Würtz et al. ergab, dass Veränderungen des Metabolismus verzweigtkettiger und aromatischer Aminosäuren einer Hyperglykämie in der Allgemeinbevölkerung vorausgehen. Unter den metabolischen Zwischenprodukten

waren BCAAs und andere Metabolite nach 6,5-jähriger Nachbeobachtung sowohl für Nüchtern glukose als auch für 2-Stunden-Glukose prädiktiv. Veränderungen der BCAAs folgten jedoch nicht der Glukosedynamik und glukoneogene Substrate entsprachen lediglich Veränderungen der Nüchtern glukose. Die Studie deutet darauf hin, dass Veränderungen des Metabolismus verzweigt-kettiger und aromatischer Aminosäuren potenzielle Marker für eine langfristig beeinträchtigte Insulinsensitivität sind, die im späteren Leben auf eine abgeschwächte Glukosetoleranz zurückzuführen sein kann. Die Studie setzte sich aus zwei finnischen bevölkerungsbasierten Kohorten zusammen, der Pieksämäki-Kohorte und der Health 2000 Study. Die Health 2000-Studie (8.028 Personen) war repräsentativ für die finnische Bevölkerung im Alter von 30 Jahren und darüber. Eine ergänzende Studie mit 1.353 Teilnehmern im Alter von 46 bis 76 Jahren wurde durchgeführt, um Diabetes-Risikofaktoren genauer zu untersuchen; diese Gruppe wurde in dieser Studie analysiert. Insgesamt wurden bei 2.090 Teilnehmern aus den beiden Kohorten die Glukosetoleranz und umfassende Metabolitendaten gemessen [180].

In der bevölkerungsbasierten Cardiovascular Risk in Young Finns Study wurden bei 1.680 Personen die Werte von Isoleucin, Leucin, Valin, Phenylalanin, Tyrosin und sechs weiteren Aminosäuren gemessen. Die IR wurde zu Beginn und nach 6 Jahren mittels HOMA-IR ("Homeostasis Model Assessment", eine Methode zur Abschätzung der IR und der  $\beta$ -Zell-Funktion der Bauchspeicheldrüse) erfasst. Die Studie untersuchte, ob Aminosäureprofile zur Risikobewertung der IR im frühen Erwachsenenalter beitragen könnten.

Die prospektiven Analysen von Würtz et al. deuten darauf hin, dass verzweigt-kettige und aromatische Aminosäuren die zukünftige Beeinträchtigung der Insulinsensitivität bei jungen Erwachsenen vorhersagen können, wobei die Assoziationen bei Männern ausgeprägter waren als bei Frauen. Isoleucin, Leucin, Valin, Phenylalanin und Tyrosin waren zu Beginn bei Männern nach 6 Jahren mit der HOMA-IR assoziiert, während bei Frauen nur Leucin, Valin und Phenylalanin die 6-Jahres-HOMA-IR vorhersagten.

Diese Studie zeigt, dass die zirkulierenden Spiegel verzweigt-kettiger und aromatischer Aminosäuren den IR-Index 6 Jahre später bei normoglykämischen

Personen vorhersagen, selbst wenn die IR und die konventionellen Risikofaktoren berücksichtigt werden [72].

Shaham et al. haben ähnliche Tendenzen feststellen können. Die multivariate Analyse ergab, dass die Abnahme von Leucin und Isoleucin (Marker für Lipolyse bzw. Proteolyse) gemeinsam den stärksten Prädiktor für die Insulinsensitivität darstellen [181].

Alena Stančáková et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen Glykämie und 43 genetischen Risikovarianten für Hyperglykämie/Typ-2-Diabetes und Aminosäurespiegeln in der bevölkerungsbasierten Metabolic Syndrome in Men (METSIM)-Studie, an der 9.369 nicht diabetische oder neu diagnostizierte finnische Männer mit Typ-2-Diabetes teilnahmen.

Alanin, Leucin, Isoleucin, Tyrosin und Glutamin sagten in einer 4,7-jährigen Nachbeobachtungsphase der METSIM-Studie das Auftreten von Typ-2-Diabetes voraus. Ihre Auswirkungen wurden weitgehend durch IR vermittelt.

Die Spiegel aller Aminosäuren zeigen negative Korrelationen (mit Ausnahme von Glutamin, das positiv korrelierte) mit der Insulinempfindlichkeit. Insbesondere Isoleucin zeigte die stärkste Korrelation mit verringerter Insulinempfindlichkeit. Alena Stančáková et al. führten auch statistische Analysen in einer größeren Stichprobe durch, die alle 1.624 erneut untersuchten Teilnehmer\*innen, die während der Nachbeobachtungszeit keinen Diabetes entwickelten und 151 Teilnehmer, die einen Typ-2-Diabetes entwickelten, einschloss. Die Ergebnisse blieben im Wesentlichen ähnlich [86].

Rebholz et al. analysierten prospektiv bekannte Metaboliten mit einem ungezielten Ansatz in Serumproben von der Ausgangssituation (1987-1989) und dem Auftreten von Diabetes in einer Untergruppe von 2.939 Teilnehmer\*innen, bestehend aus schwarzen und weißen Männern und Frauen mittleren Alters, der Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC)-Studie mit Metabolomics-Daten und ohne bekannten Diabetes.

Unter den 245 identifizierten Stoffen waren sieben Metaboliten signifikant mit dem Auftreten von Diabetes assoziiert; dazu gehörten Isoleucin, Leucin und Valin.

Höhere Werte der Metaboliten wurden mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten von Diabetes in Verbindung gebracht. Diese verbesserten mit den anderen Metaboliten die Vorhersage des Diabetes-Auftretens über den Nüchternblutzucker und etablierte Risikofaktoren hinaus und waren unabhängig voneinander mit der Diabetesentwicklung über 20 Jahre assoziiert, selbst nach Berücksichtigung soziodemografischer Daten und Nüchternglukosespiegel [182].

Yu et al. untersuchten die Assoziationen von Plasmametaboliten mit dem Risiko und der Prävalenz von T2DM bei 976 chinesischen Männern und Frauen (40-74 Jahre), die an zwei prospektiven Kohortenstudien teilnahmen. Es handelte sich dabei um die erste populationsbasierte, längsschnittliche Metabolomik-Studie für T2DM bei chinesischen Erwachsenen. Laut der Studie ist Valin einer der sechs Metaboliten, die unabhängige Assoziationen mit dem Auftreten von T2DM aufwies. Jeder Anstieg des Valinspiegels durch Standardabweichung war mit einer Veränderung des Diabetesrisikos um 40 bis 150% verbunden.

Die Risikovorhersage wurde erheblich verbessert, indem diese Metaboliten zusätzlich zu den bekannten T2DM-Risikofaktoren, einschließlich zentraler Adipositas und Glukose, berücksichtigt wurden. Die konsistenten Ergebnisse für BCAAs in der Studienpopulation bestätigen die Hinweise auf mögliche kausale Zusammenhänge [183].

McCormack et al. haben in einer Querschnittskohorte von Kindern und Jugendlichen nachgewiesen, dass Fettleibigkeit mit erhöhten zirkulierenden Nüchternkonzentrationen der drei BCAAs sowie Glutamat, einem Produkt des BCAA-Abbaus, verbunden war. Die Studie ergab auch, dass diese erhöhten BCAA-Werte eine zukünftige IR vorhersagen können. Es nahmen 69 gesunde Probanden im Alter zwischen 8 und 18 Jahren teil. Bei einer Untergruppe von Probanden, die 18 Monate lang in Längsrichtung beobachtet wurden, ergab die Studie, dass die BCAA-Ausgangswerte positiv mit HOMA-IR assoziiert waren. In der Studie wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen den BCAA-Konzentrationen und der IR zu Studienbeginn in der Querschnittskohorte festgestellt. Es wurde auch keine Korrelation zwischen der Nahrungsaufnahme von BCAAs und ihren Plasma-Nüchternkonzentrationen identifiziert. Insgesamt deutet die Studie darauf hin, dass Veränderungen des BCAA-Stoffwechsels eine Rolle bei der frühen Pathogenese

von Typ-2-Diabetes bei übergewichtigen Kindern spielen könnten. Die BCAA-Konzentrationen standen in keinem Zusammenhang mit der Rasse, der ethnischen Zugehörigkeit und der täglichen Kalorienzufuhr [59].

In dieser Studie haben Palmer et al. ein metabolisches Profiling durchgeführt, um Stoffe zu finden, die im Zusammenhang mit der Sensibilität gegenüber Insulin und dem Risiko, T2DM zu entwickeln, stehen. Sie untersuchten 196 Teilnehmer unterschiedlicher Herkunft, darunter Europäer, Hispanoamerikaner und Afroamerikaner. Bei einer detaillierten Analyse von 72 Personen mit hoher und 75 Personen mit niedriger Insulinsensitivität stellten sie fest, dass diejenigen mit einer geringeren Insulinsensitivität weniger Glycin und mehr Valin und Leucin in ihrem Blut hatten. Dieser Trend war besonders deutlich bei Personen europäischer Herkunft. Palmer et al. beobachtete ein ähnliches Aminosäureprofil bei Personen die später T2DM entwickelten verglichen mit Individuen, welche keinen T2DM entwickelten. Diese Unterschiede waren auch ein Indikator dafür, wer später T2DM entwickeln könnte [184].

Höhere Konzentrationen von BCAAs können unabhängige Prädiktoren für das Auftreten von T2DM sein. Die Studie umfasste Teilnehmer aus ELSA-Brasil ohne Diabetes zu Studienbeginn und verfolgte sie  $3,9 \pm 0,6$  Jahre lang. Von 3.828 Teilnehmer\*innen wurde bei 299 T2DM diagnostiziert. Bei beiden Geschlechtern wurde bei steigenden BCAA-Quartilen eine Verschlechterung des kardiometabolischen Profils beobachtet [185].

Bei Prädiabetes-Patient\*innen trat ein signifikanter Anstieg der BCAAs im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Außerdem kam man zu dem Schluss, dass BCAAs mit der IR positiv zunahmen [186].

In einer groß angelegten prospektiven bevölkerungsbasierten Kohortenstudie untersuchten Flores-Guerrero et al. die Zusammenhänge zwischen den Plasmakonzentrationen von BCAAs und dem Risiko für T2DM. Basischarakteristika wie männliches Geschlecht, höheres Alter und hoher BMI waren positiv mit hohen BCAA-Konzentrationen assoziiert. In der Studie hatten Männer höhere BCAA-

Konzentrationen im Vergleich zu Frauen. Sie bewerteten die potenziellen Assoziationen von BCAAs mit T2DM bei 6.244 Probanden. Die Studie ergab, dass BCAAs positiv mit IR und einem erhöhten Risiko für T2DM assoziiert waren und über 7,5 Jahre der Nachbeobachtung mit einem erhöhten Risiko für neu auftretenden T2DM verbunden waren. Die Ergebnisse zeigen auch, dass BCAAs die Vorhersagekraft eines herkömmlichen Risikomodells verbessern können [187].

In der Arbeit von Chen et al. wurde eine Längsschnitt- und eine Querschnittsstudie an insgesamt 429 chinesischen Teilnehmern in unterschiedlichen Stadien der Diabetesentwicklung durchgeführt, um die potenzielle Rolle von BCAAs und AAAs bei der Vorhersage der Entwicklung von Diabetes in der chinesischen Bevölkerung zu bewerten.

Man stellte fest, dass eine frühe Erhöhung der fünf Aminosäuren (Valin, Leucin, Isoleucin, Tyrosin und Phenylalanin) und ihres kombinierten Scores eng mit der zukünftigen Entwicklung von Diabetes verbunden war [188].

Lee et al. untersuchten den Zusammenhang von Plasma-BCAAs mit der Insulinsensitivität und anderen Faktoren in einer multiethnischen Kohorte.

Die Kohorte bestand aus 685 Teilnehmern ohne Diabetes der Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). Zu den Studienteilnehmer\*innen gehörten 290 Kaukasier, 165 Afroamerikaner und 230 Hispanoamerikaner.

Erhöhte Plasma-BCAAs waren positiv mit Nüchterninsulin und negativ mit Insulinsensitivität assoziiert. Dieser Zusammenhang war besonders bei Kaukasiern und Hispanoamerikanern signifikant, aber nicht bei Afroamerikanern. Die Studie kam zu dem Schluss, dass Plasma-BCAAs bei Kaukasiern und Hispanoamerikanern mit einem erhöhten Risiko für Diabetes assoziiert sind [189].

In einer 14-jährigen Follow-up Studie von Liu et al. konnte bei Menschen mit erhöhten BCAA-Plasmaspiegeln ein erhöhtes Diabetesrisiko mehr als 10 Jahre vor dessen Entwicklung festgestellt werden. Dabei wurden 2.776 Teilnehmer der Erasmus-Rucphen-Familienstudie (ERF), eine prospektive familienbasierte Studie im Südwesten der Niederlande, von denen 1.571 krankheitsfreie Personen bis zu 14 Jahre lang verfolgt wurden, analysiert.

Es wurde gezeigt, dass die kombinierte Wirkung von 24 Metaboliten, die Entstehung eines künftigen T2DM vorhersagen konnte. Das ERF-Stoffwechselmodell verbesserte die Vorhersageleistung des FHS-Stoffwechselmodells (Framingham Heart Study) und des Nüchternblutzuckers deutlich. Liu et al. konnten zeigen, dass das kombinierte Metabolitenmodell künftige T2DM-Fälle besser vorhersagt als der Nüchternblutzucker in der Bevölkerung, die weiblich, jünger als 50 Jahre oder normalgewichtig sind [190].

Neben den BCAAs als potentieller prädiktiver Biomarker bei Prädiabetes und T2DM wurden auch die Metabolite von BCAAs in Studien herangezogen.

3-Hydroxyisobutyrat (3-HIB) ist ein katabolisches Zwischenprodukt der BCAA Valin. Nilsen et al. haben in einer Studie gezeigt, dass in einer Kohorte von knapp 5.000 Männern und Frauen der zirkulierende 3-HIB-Spiegel in Abhängigkeit vom Grad der Hyperglykämie und des etablierten T2DM erhöht ist.

Laut dieser Studie stehen erhöhte Konzentrationen von 3-Hydroxyisobutyrat in engem Zusammenhang mit IR und T2DM. Darüber hinaus wurden in der Studie positive Korrelationen zwischen zirkulierenden 3-HIB-Konzentrationen und HOMA2-IR festgestellt. Sie folgerten, dass BCAA-Abbauprodukte, insbesondere 3-HIB, als Marker zur Vorhersage von Diabetes verwendet werden können [46].

Menni et al. legen jedoch nahe, dass möglicherweise nicht die erhöhten Konzentrationen von BCAAs zu Diabetes beitragen, sondern vielmehr ihr Abbau, wie die Konzentrationen der BCAA-Abbauprodukte, der  $\alpha$ -Ketosäuren, zeigen. Sie untersuchten mit Hilfe des metabolischen Profils mehr als 2.000 Personen aus der bevölkerungsbasierten Twins UK-Studie und berichteten, dass der stärkste prädiktive Biomarker für eine gestörte Glukosetoleranz das BCAA-Abbauprodukt 3-Methyl-2-Oxovalerat war [191].

## **2.5 Tumore Einleitung**

Krebszellen haben ein unbegrenztes Potenzial, sich zu teilen und weiter zu wachsen. Dieser Prozess ist abhängig davon, dass sie essentielle Nährstoffe aus der Mikroumgebung des Tumors erhalten, die zur Aufrechterhaltung der Zellmasse und des Überlebens verwendet werden, selbst unter Bedingungen mit schlechter Nährstoff- und Sauerstoffverfügbarkeit [192–194]. Die metabolische Flexibilität von

Krebszellen wird durch ihre Fähigkeit bestimmt, anabole und katabole Stoffwechselwege umzuprogrammieren, indem sie Genexpressionsprogramme sowie interzelluläre Wechselwirkungen innerhalb der Tumormikroumgebung verändern [195].

Der Prozess der Onkogenese ist abhängig von Aminosäuren, den Bausteinen für die Proteinsynthese und eine Quelle für Energie und Metaboliten [194]. Viele Krebsarten überexprimieren Enzyme, die für den Abbau von Aminosäuren zuständig sind, die nicht nur zelluläre Energie und Stoffwechselprodukte für anabole Prozesse liefern, sondern auch als Mechanismen zur Umgehung des Immunsystems durch Krebszellen dienen [193–196].

### **2.5.1 Pankreaskarzinome**

Pankreaskarzinome sind häufig mit 432.000 Todesfällen und 459.000 Fällen weltweit im Jahr 2018 [197] und eine äußerst aggressive und schnell wachsende Krebsart [198–200], die oft erst entdeckt wird, wenn kurative Therapien nicht mehr möglich sind.

Die Inzidenzraten sind in Ländern mit einem hohen Human Development Index (HDI) höher, vor allem in Europa, Nordamerika und Australien/Neuseeland [197].

Das Risiko, an Bauchspeicheldrüsenkrebs zu erkranken, steigt mit dem Alter: Etwa 80% der Patient\*innen mit Bauchspeicheldrüsenkrebs sind mindestens 60 Jahre alt und das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Diagnose liegt bei 71 Jahren [201].

Von den Pankreastumoren sind die pankreatischen duktaalen Adenokarzinome (PDAC) mit ca. 95% die häufigsten Vertreter, die zudem zu den tödlichsten Tumoren gehören mit einer Sterblichkeit von über 90% im ersten Jahr nach der Diagnose [202]. Die Häufigkeit des PDAC hat in den letzten Jahren zugenommen [203].

Die 5 Jahres-Überlebensrate liegt bei weniger als 10%, da die meisten Patient\*innen symptomatisch werden, wenn der Krebs im fortgeschrittenen Stadium, invasiv oder metastasiert ist, in denen eine operative Therapie wenig aussichtsreich ist.

Die Bandbreite an Therapiemöglichkeiten ist beim Pankreaskarzinom stark begrenzt.

Von den 10-20% der Patient\*innen, bei denen eine operative Therapie in Frage käme, erliegen 80% später der Erkrankung. Bei Patient\*innen, die nicht operativ

therapiert werden können, wird mittels Strahlen-und/oder Chemotherapie versucht das Überleben zu verlängern [204].

Die Chirurgie ist nach wie vor die einzige kurative Therapie für Bauchspeicheldrüsenkrebs [205]. Obwohl eine erfolgreiche Operation der Bauchspeicheldrüse möglich ist, werden nur 20-25 % der Patient\*innen in einem frühen Krankheitsstadium diagnostiziert, in dem eine Resektion wirksam ist [206]. Darüber hinaus beträgt die mediane Überlebenszeit nach der Operation selbst bei erfolgreicher Operation nur 17-23 Monate, was sowohl auf die Resistenz des Pankreaskarzinoms gegenüber Chemotherapie [207] als auch auf die Diagnose im fortgeschrittenen Stadium zurückzuführen ist [206].

Obwohl die genauen Ursachen von Pankreaskrebs nicht vollständig verstanden werden, gibt es mehrere identifizierte Risikofaktoren, die das Auftreten dieser Krankheit beeinflussen können. Diese umfassen Alter, Tabakkonsum, Alkoholkonsum, Fettleibigkeit, chronische Pankreatitis, T2DM, Exposition gegenüber bestimmten Chemikalien wie Pestiziden, Herbiziden und Fungiziden. Eine genetische Prädisposition als Ätiologie gilt als gesichert.

Die ersten Symptome sind unspezifisch und umfassen Rückenschmerzen und epigastrisches Unbehagen. Zum Zeitpunkt der Diagnose haben die meisten Tumoren bereits Metastasen gebildet oder sind in kritische Strukturen eingedrungen und kommen daher für eine Resektion nicht in Frage. Diabetes oder Hyperglykämie gehen der PDAC-Diagnose oft bis zu 2 Jahre voraus [208].

Schätzungen zufolge haben etwa 40-50% der neu diagnostizierten PDAC-Patient\*innen zum Zeitpunkt der Diagnose Diabetes [209].

Viele der neu diagnostizierten Patient\*innen berichten über einen vorangegangenen Gewichtsverlust. Die meisten Patient\*innen entwickeln schließlich eine Kachexie, ein Muskelschwundsyndrom, das bei PDAC besonders schwerwiegend ist [208].

Da IR mit einem erhöhten Risiko für Bauchspeicheldrüsenkrebs in Verbindung gebracht wird, könnte IR auch eine Rolle bei der malignen Transformation der Vorläuferläsionen spielen [210].

### **2.5.2 PDAC Diagnostik**

Neben der Anamnese und der klinischen Untersuchung kommen den bildgebenden Verfahren eine besondere Bedeutung zu.

Der endoskopische Ultraschall (EUS) ist eine äußerst sensitive Methode, die sich besonders gut eignet, um kleine Pankreastumore zu erkennen. Neben der Bildgebung erlaubt der EUS auch die Entnahme von Gewebeproben durch Feinnadelaspiration, wodurch ein zytologischer Nachweis des Tumors möglich wird. Im Gegensatz dazu gilt die Computertomographie (CT) des Abdomens als Goldstandard in der medizinischen Praxis, wenn es darum geht, Lage, Größe, Infiltration benachbarter Strukturen und das Vorhandensein von Metastasen zu beurteilen. Ein weiteres bildgebendes Verfahren ist die Magnetresonanztomographie (MRT) in Kombination mit der Magnetresonanztomographie-Cholangiopankreatographie (MRCP). Diese liefern detaillierte Aufnahmen von der Bauchspeicheldrüse und den umliegenden Strukturen. Sie sind besonders wertvoll bei der Beurteilung der Gallenwege und bei der Erkennung von Lebermetastasen. Schließlich gibt es noch die endoskopische retrograde Cholangiopankreatographie (ERCP), die früher häufig für diagnostische Zwecke eingesetzt wurde. Heutzutage wird sie jedoch hauptsächlich therapeutisch verwendet, insbesondere zur Platzierung von Stents bei Patient\*innen mit obstruktivem Ikterus.

Zusätzlich zu diesen Indikatoren können in der routinemäßigen Blutuntersuchung auch Veränderungen in anderen Organfunktionen beobachtet werden, die durch den Tumor beeinflusst werden könnten. Es ist wichtig zu betonen, dass, obwohl Tumormarker wie das Karzinoembryonale Antigen (CEA) und das CA 19-9 bei Patient\*innen mit Pankreaskarzinom erhöht sein können, diese Erhöhungen auch in anderen Erkrankungen vorkommen können. Daher sollten diese Marker im Kontext weiterer diagnostischer Untersuchungen und klinischer Symptome betrachtet werden. Die genannten Marker allein reichen nicht aus, um die Diagnose eines Pankreaskarzinomes zu stellen. Stattdessen spielen sie eine nützliche Rolle bei der Überwachung des Krankheitsverlaufs und der Reaktion auf die Therapie.

### **2.5.3 Pathogenese des PDAC**

Es gibt verschiedene Vorläuferläsionen, die zum invasiven duktalem Adenokarzinom des Pankreas führen. Zu diesen Vorläuferläsionen zählen intraduktale papilläre

muzinöse Neoplasien (IPMN), muzinöse zystische Neoplasien (MCN) und pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIN) [211].

Intraduktale papilläre muzinöse Neoplasien (IPMN) und muzinöse zystische Neoplasien (MCN) sind heilbare Präkanzerosen, die mit den derzeit verfügbaren bildgebenden Verfahren erkannt werden können, während pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIN) normalerweise zu klein sind, um präoperativ erkannt zu werden [212].

Insgesamt ist die beträchtliche Überlappung zwischen PanINs und frühen IPMNs eines der Hauptthemen, die derzeit diskutiert werden. So ist beispielsweise nach wie vor unklar, ob Läsionen, die zu IPMN werden sollen, de novo entstehen oder ob IPMN aus frühen PanIN-Läsionen hervorgehen, oder ob beide Szenarien existieren [213].

Genetische Studien haben eine große Anzahl von Mutationen identifiziert, die Signalwege beeinflussen [214]. Zu diesen genetischen Variationen gehören K-RAS, die Tumorsuppressoren p53 und p16 sowie Veränderungen im TGF- $\beta$ - und WNT/NOTCH-Signalweg [215].

RAS-Proteine spielen eine aktive Rolle bei der Zelldifferenzierung, -proliferation, -migration und -apoptose, was sie zu wichtigen Signalgebern für Krebs macht [216].

K-RAS ist ein kleines GDP/GTP-bindendes Protein, das extrazelluläre Signale in intrazelluläre Reaktionen umwandelt.

Es kann zwischen einem inaktiven Zustand, in dem es an GDP gebunden ist und einem aktiven Zustand, in dem es an GTP gebunden ist, wechseln. Dieser Wechsel wird durch spezielle Proteine, die als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) und GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) bekannt sind, streng reguliert [217]. In seinem aktiven Zustand bindet und aktiviert K-RAS verschiedene Effektorproteine und reguliert so nachgeschaltete Signalwege.

K-RAS spielen eine aktive Rolle bei verschiedenen zellulären Prozessen, darunter Überleben, Wachstum, Proliferation, Differenzierung und Apoptose der Zelle [218].

Mehr als 90% der Bauchspeicheldrüsentumore enthalten Mutationen im K-RAS2-Onkogen (K-RAS1 ist ein Pseudogen und K-RAS2 ist das Proto-Onkogen, das bei bestimmten Krebsarten häufig mutiert ist), welche zu einer dominanten aktiven Form der K-RAS-GTPase führt [219].

Während aktivierende Mutationen in K-RAS für die Initiierung in den meisten PDAC-Fällen verantwortlich sind, haben in vitro- und in vivo-Studien sowohl an Menschen als auch an Mausmodellen gezeigt, dass die Krankheitsprogression nachfolgende Mutationen und/oder den Verlust der Genfunktion erfordert, wie bei Trp53 (p53), SMAD4, CDKN2A und BRCA2, die ein weiteres abweichendes Zellüberleben und -proliferation auslösen und die K-RAS-induzierte Seneszenz überwinden [204].

Entscheidend ist, dass die Inaktivierung von K-RAS in p53-mutierten Mäusen mit Krebs zu Apoptose und Tumorrückbildung führt, obwohl es auch hier Anzeichen für eine anhaltende Fibrose gibt. Der Verlust von Tumorzellen als Reaktion auf die Inaktivierung von K-RAS deutet darauf hin, dass aktiviertes K-RAS eine Voraussetzung für die Erhaltung von Bauchspeicheldrüsenkrebs ist [220].

In weiterer Folge wird eine Krebszellen-Signalkaskade ausgelöst, wie z. B. die Signalkaskade von AKT, welche die weitere Tumorentstehung fördert [221].

## **2.6 Einfluss des BCAA-Stoffwechsels auf die Pankreaskarzinomentstehung**

Eine wachsende Zahl an Forschungsarbeiten hat ergeben, dass die Konzentrationen zirkulierender BCAA-Metaboliten positiv mit einigen ortsspezifischen Krebsarten in Verbindung stehen, darunter Pankreaskarzinome [222].

Insbesondere Leucin wurde mit dem Wachstum von Bauchspeicheldrüsentumoren in einem fettleibigen Mausmodell in Verbindung gebracht [10].

Die Ergebnisse von Liu et al. zeigen, dass eine Leucin-Supplementierung das Tumorwachstum sowohl bei schlanken als auch bei übergewichtigen Mäusen durch

ernährungsabhängige Effekte in einem Mausmodell für Bauchspeicheldrüsenkrebs steigert [10].

In Anbetracht der Tatsache, dass die überwiegende Mehrheit der PDACs durch K-RAS ausgelöst wird und dass K-RAS eine wichtige Rolle beim Abbau von Nährstoffen spielt [218, 223], könnten erhöhte Plasmaspiegel von BCAAs auf eine wichtige Rolle des Proteinabbaus bei K-RAS-mutierten PDACs hinweisen [24].

Der Stoffwechsel der BCAAs steht möglicherweise mit der Entwicklung des PDAC in Verbindung [224].

Bei Krebserkrankungen verbessern BCATs die BCAA-Aufnahme, um den BCAA-Katabolismus statt der Umwandlung von BCKAs in BCAAs aufrechtzuerhalten und unterstützen die mitochondriale Atmung [224, 225].

Zudem wurden hohe Konzentrationen von Enzymen im BCAA-Stoffwechselweg mit Krebswachstum und -überleben in Verbindung gebracht [226]. Daneben haben Li et al. gezeigt, dass BCAT2 in Mausmodellen und im menschlichen PDAC erhöht ist [224], während die Enzyme, die verzweigt-kettige Ketosäuren metabolisieren, gleichzeitig vermindert sind [227].

Tatsächlich nehmen Krebszellen vermehrt BCAAs auf [228] und BCAA-Aminotransferasen (BCATs) sind in Krebszellen überexprimiert [227, 229]. Darüber hinaus sind die BCAT2-Proteinkonzentrationen in PDAC-Zellen deutlich erhöht, was zur Annahme leitet, dass der BCAA-Metabolismus eine wichtige Rolle bei der Proliferation von PDAC-Zellen spielt [226, 230].

Unter physiologischen Bedingungen weist das exokrine Pankreas von allen Geweben die höchste BCAT2-Aktivität auf [231]. Die Überexpression von BCAT2 kann aggressives Tumorwachstum wiederherstellen, was darauf hinweist, dass PDACs auf BCAAs aus dem Kreislauf angewiesen sind, um Vorläufer für biosynthetische Prozesse über BCAT2 bereitzustellen. Die Autoren schließen daraus, dass Enzyme des BCAA-Stoffwechselweges, wie z. B. BCAT2, für das Wachstum und Überleben von PDACs von entscheidender Bedeutung sind [230].

Li et al. untersuchten die Rolle und zugrundeliegenden Mechanismen des Metabolismus der BCAAs bei der Entwicklung der PDACs. Sie haben herausgefunden, dass die gewebspezifische Ausschaltung von BCAT2 das Fortschreiten der pankreatischen intraepithelialen Neoplasie (PanIN) in Mäusen verhindert. Darüber hinaus fanden sie heraus, dass BCAT2 in Mausmodellen und humanen PDACs erhöht ist und dass der BCAT2-vermittelte BCAA-Katabolismus entscheidend für die Entwicklung von PDACs, die K-RAS-Mutationen beherbergen, ist.

Sie entdeckten auch, dass die gezielte Bekämpfung von BCAT2 oder die Senkung der durch Ernährung zugeführten BCAAs eine klinische Bedeutung haben können. Sie folgerten, dass eine Beeinträchtigung der BCAA-BCAT2-Achse die Entwicklung von PDACs verhindert [224].

Auf den Erkenntnissen von Li et al. beruhend haben Lei et al. entdeckt, dass eine Mutation des BCAT2-Enzyms den BCAA-Katabolismus, die Zellproliferation und das Wachstum von Pankreastumoren fördert [232].

In einer anderen Studie wurde ein anderer Mechanismus exploriert, der bei PDACs eine Rolle spielt. So wurde festgestellt, dass der BCAA-Stoffwechsel eine wichtige Rolle beim Wachstum der PDACs spielt, indem er die Lipogenese reguliert. Im Vergleich zu nicht transformierten humanen duktalem Pankreaszellen zeigten PDAC-Zellen eine signifikant erhöhte BCAA-Aufnahme durch Solute-Carrier-Transporter, die in Pankreastumorgewebe im Vergleich zu normalem Gewebe stark hochreguliert waren.

Die Ausschaltung von Schlüsselenzymen, einschließlich BCAT2 und BCKDHA, hemmt die PDAC-Zellproliferation erheblich und die Unterdrückung des BCAA-Stoffwechsels führt zu einer deutlichen Verringerung der Fettsäurespiegel [226].

In anderen Krebsarten wie dem Glioblastom und Eierstockkrebs ist die Isoform BCAT1, das wichtigste Enzym, das sich mit dem Krebswachstum in Verbindung bringen lässt, stark exprimiert [233].

Aufgrund der hohen Expressionsraten in einer Vielzahl von Krebszellen wird spekuliert, dass LAT1 als Schlüsseltransporter für die hocheffektive Zufuhr essentieller Aminosäuren, darunter Leucin, in Krebszellen fungiert [234].

## **2.7 Rolle von mTOR auf die Tumorentstehung**

MTORC1 spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und dem Fortschreiten verschiedener Krebsarten [235].

Zu den am stärksten betroffenen Signalwegen gehört der PI3K-AKT-mTOR-Signalweg für das Zellüberleben. Der PI3K-Signalweg reguliert eine Reihe von Prozessen, die bei Krebs eine zentrale Rolle spielen, darunter Zellwachstum, Eintritt in den Zellzyklus, Zellüberleben und den Stoffwechsel [236]. Krebserkrankungen weisen eine abnorme Aktivierung dieses Signalwegs auf, die auf verschiedene Mechanismen zurückzuführen sind, darunter die Überexpression oder Amplifikation von Wachstumsfaktorrezeptoren, aktivierende Mutationen der Kinasen des Signalwegs (PI3K, AKT) oder der Funktionsverlust von Hemmproteinen (PTEN, TSC2) [237].

Eine RAS-Mutation aktiviert PI3K. Sobald PI3K aktiviert ist, bindet es an PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat), eine Komponente der Zellmembran, und phosphoryliert PIP2 zu PIP3 (Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphat), das wiederum die Aktivitäten vieler Signalproteine regulieren kann, insbesondere der 3-Phosphoinositid-abhängigen Proteinkinase-1 (PDK1 oder PDK1) und der AKT-Serin/Threonin-Kinase. Nach der von PIP3 abhängigen Rekrutierung an der Plasmamembran wird AKT von PDK1 phosphoryliert, die ihrerseits mit PIP3 an der Plasmamembran assoziiert ist. AKT fördert die Aktivierung der kleinen GTPase Rheb, die dann mTOR aktiviert [218].

Wenn der TSC-Komplex inaktiviert ist, wird mTOR aktiviert und fördert das Zellwachstum und die Zellproliferation. Mutationen in diesen Elementen oder in PTEN, einem negativen Regulator von PI3K und Tumorsuppressor, können zu einer Fehlregulation beitragen und die Pathophysiologie von Krebs beeinflussen [238].

Im Allgemeinen ist das Tumorwachstum durch eine anfängliche Phase schneller Proliferation gekennzeichnet, die sich dann verlangsamt, wenn die bösartigen Zellen ihre Blutversorgung übersteigen und hypoxisch werden [239]. Anpassungen an die Hypoxie, zu denen Veränderungen im Zellstoffwechsel und die Neovaskularisierung (Angiogenese) gehören, sind für das weitere Tumorwachstum notwendig [15].

Eine Zunahme der konstitutiven Aktivität von mTORC1 fördert das Wachstum und die Invasivität vieler aggressiver Tumore. Dies ist auf mehrere Mechanismen zurückzuführen. Neben der erhöhten Aktivität von mTORC1, die das Zellwachstum und die Zellproliferation fördert, erhöht mTORC1 darüber hinaus die zelluläre Konzentration von HIF-1 $\alpha$ . Dies wiederum stimuliert die Produktion von proangiogenen Faktoren wie VEGF, PDGF- $\alpha$  und TNF- $\alpha$ . Dabei ist HIF ein wichtiger Stimulus für die Angiogenese. Eine verstärkte Angiogenese ist notwendig, um den steigenden Sauerstoffbedarf wachsender Tumore zu decken [15].

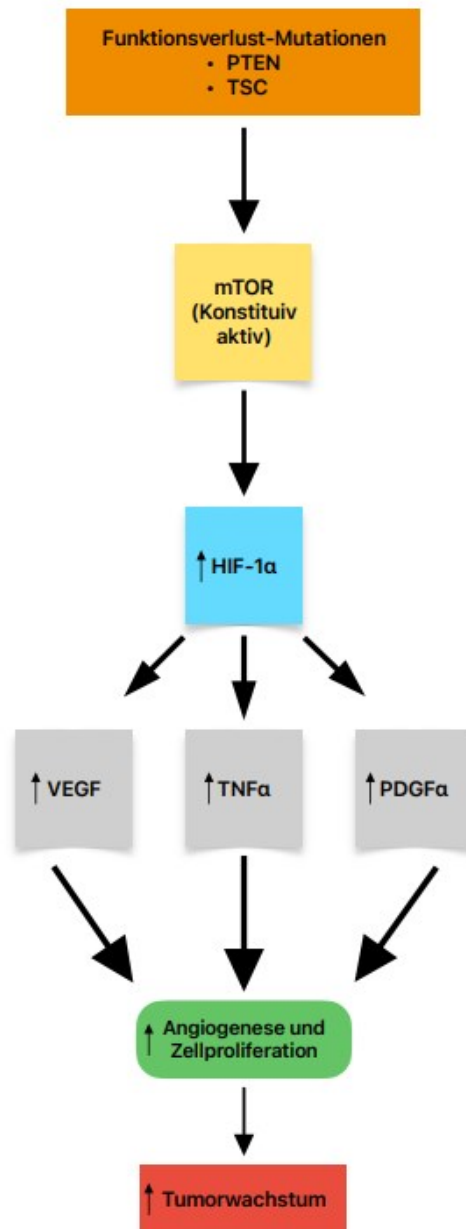


Abbildung 6: mTOR-Beteiligung bei der Tumorentstehung. Modifiziert nach: [15].

### **2.7.1 Rolle von mTOR bei Pankreaskarzinomen**

Die mTOR-Signalgebung spielt häufig eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung von Bauchspeicheldrüsenkrebs [240–245] und steht im Zusammenhang mit dem Glukosestoffwechsel im Tumor [246].

Es gibt verschieden Arbeiten, die sich mit unterschiedlichen Punkten in der mTOR-Signalgebung beschäftigt haben.

Die Studie von Kumari et al. hebt die zentrale Rolle von PKD1 in der Regulation des Glukosestoffwechsels bei Bauchspeicheldrüsenkrebs hervor, welcher entscheidend für die Tumorentstehung, Chemoresistenz und Tumorprogression ist. PKD1 wird bei Bauchspeicheldrüsenkrebs abnormal exprimiert und ist in menschlichem Bauchspeicheldrüsenkrebsgewebe und -zellen hochreguliert. MTORC1 reguliert, insbesondere durch die Aktivierung seiner Haupteffektoren pS6K und 4EBP1, PKD1-induzierte metabolische Veränderungen. Dies wird besonders deutlich, wenn PKD1 überexprimiert wird, wodurch mTORC1 in Bauchspeicheldrüsenkrebszellen phosphoryliert und aktiviert wird [247].

Die Aktivierung von mTORC1 phosphoryliert S6K und 4E-BP, wodurch nachgeschaltete Proteine, die an der Initiation und Elongation beteiligt sind, phosphoryliert/aktiviert werden [248]. Kumari et al. fanden heraus, dass die Überexpression von PKD1 in Pankreaskarzinomzellen zu einer verstärkten Phosphorylierung der beiden Effektoren von mTORC1, pS6kinase und 4EBP1, führt. Zusätzlich zur erhöhten Expression von pS6-Kinase und 4EBP1 wurde bei der Überexpression von PKD1 eine Hochregulierung von phosphoryliertem AKT, einem wichtigen Effektor von mTORC2, beobachtet. Dies deutet auf die Aktivierung beider mTOR-Komplexe, mTORC1 und mTORC2, hin [247].

Die Rolle von mTORC2 bei K-RAS gesteuerter Tumorentstehung wurde weitergehend in der Arbeit von Driscoll et al. untersucht. Die Studie zeigt, dass der mTORC2-Signalweg, insbesondere seine Untereinheit Rictor, für die K-RAS-gesteuerte Tumorentstehung und die Entwicklung von PanINs unerlässlich ist. Der mTORC2-Signalweg ist in diesem Prozess ein wichtiger nachgeschalteter Effektor

von K-RAS. In der Studie wurde ein Mausmodell, welches menschliche PanIN-Läsionen nachahmt und zu einem PDAC führen kann, verwendet. Die Deletion von Rictor verzögerte die Tumorentstehung und verringerte die Anzahl der PanIN-Läsionen. Eine kombinierte Behandlung, die sowohl mTORC1/2 als auch PI3K hemmt, erhöhte die Überlebensrate bei Mäusen im Spätstadium mit Tumoren signifikant. Diese Befunde unterstreichen die zentrale Rolle von K-RAS und dem mTORC2-Signalweg bei der Entstehung und Progression von PanINs und Bauchspeicheldrüsenkrebs [240].

Die Bedeutung der PI3K-Signalübertragung als ein wichtiger Vermittler der Auswirkungen des onkogenen K-RAS in der Bauchspeicheldrüse, wurde hervorgehoben. Dabei ist mTOR einer der wichtigsten nachgeschalteten Effektoren der PI3K-Signalübertragung [249].

Ein Markenzeichen des Tumorwachstums ist die Überexpression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren [250]. So sind bei Bauchspeicheldrüsenkrebs der EGFR (epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor) und der IGF-1R (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-1-Rezeptor) oft überexprimiert oder aktiviert, was zur Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs führt [251] und mit einer höheren Proliferation, Überlebensrate, Angiogenese und hochinvasiven Pankreastumoren zusammenhängt [250]. Umgekehrt kann mTOR die Expression von IGF-1R in Pankreasadenokarzinomzellen regulieren, indem es durch PKC  $\delta$  phosphoryliert wird und dadurch mTOR die Expression von IGF-1R erhöhen kann [250].

Frühere Studien haben den Verlust der Funktion von Phosphatase- und Tensin-Homolog (PTEN), das auf Chromosom 10 deletiert ist, in einigen PDACs nachgewiesen [245].

YAP (Yes-associated protein) ist ein wichtiger Transkriptionskofaktor. Es ist das Haupteffektorprotein des Hippo-Signalwegs, einem Signalweg, der Zellproliferation und Apoptose reguliert und somit eine entscheidende Rolle bei der Organentwicklung und Tumorsuppression spielt.

YAP stimuliert mTORC1 über eine Herunterregulierung von PTEN und einen erhöhten Transport von Aminosäuren wie Leucin. Die mTORC1-Aktivierung wiederum führt zu einer YAP-Akkumulation durch beeinträchtigte Autophagie, wodurch eine Verstärkungsschleife entsteht [252].

Es wurde festgestellt, dass bei 50-70% der PDACs eine Inaktivierung von p53 vorliegt, die eine Hochregulierung des Insulin/IGF-1/mTORC1-Signalwegs verursacht [252].

Eine andere Möglichkeit in der Pathogenese von Pankreastumoren liegt in der Überexpression von Aminosäuretransportern.

Die Überexpression von LAT1 kann das Krebswachstum über mTOR fördern und als prognostischer Faktor bei PDAC dienen [253, 254].

LAT2 (SLC7A8), ein weiterer wichtiger BCAA-Transporter, wird Berichten zufolge bei Krebserkrankungen abnormal exprimiert [23]. Bei Bauchspeicheldrüsenkrebs wurde gezeigt, dass LAT2 (SLC7A8) die Empfindlichkeit gegenüber Gemcitabin verringert, indem es die Glutamin-abhängige mTOR-Aktivierung reguliert und so die Proliferation fördert und die Apoptose hemmt [255].

Guo et al. fanden heraus, dass eine Überexpression von Sestrin2 die Glykolyse von Bauchspeicheldrüsenkrebszellen erhöhen und ihre Proliferation durch mTOR-Signale fördern kann. Leucin könnte Sestrin2 aktivieren, um das Wachstum und die Proliferation von Tumorzellen zu fördern. Dieser Effekt lässt sich durch mTOR-Inhibitoren aufheben. Schließlich stellten die Autoren fest, dass die Ausschaltung von Sestrin2 das Wachstum von Bauchspeicheldrüsenkrebs in vivo hemmen kann [246].

## **2.8 BCAA als Marker für PDACs**

Laut Mayers et al. ist der Plasmaspiegel der BCAAs bei PDACs im Frühstadium erhöht. Dieser Befund könnte darauf hindeuten, dass der Abbau von Proteinen im gesamten Körper ein frühes Ereignis bei PDACs ist.

Die Forscher\*innen erstellten ein Profil der Plasmastoffwechselprodukte, welche hunderte von Patient\*innen umfasste, aus vier prospektiven Kohortenstudien - sowohl bei Patient\*innen, die später ein PDAC entwickelten, als auch bei vergleichbaren Kontrollpersonen. In den Proben, die mindestens zwei Jahre vor der Diagnose entnommen wurden, zeigte sich, dass erhöhte BCAA-Plasmaspiegel mit einem erhöhten Risiko für eine spätere PDAC-Diagnose verbunden sind. Diese wurden mit sorgfältig abgestimmten Kontrollen aus denselben Studien verglichen und führte zur Identifizierung von Leucin, Isoleucin und Valin. Deren Spiegel waren signifikant mit der späteren Entwicklung von PDACs verbunden. Um das Ausmaß des mit erhöhten BCAA-Werten verbundenen Risikos zu ermitteln, teilten die Autor\*innen alle Proband\*innen in fünf Gruppen ein. Sie stellten fest, dass die Proband\*innen in der Gruppe mit den höchsten BCAA-Werten ein mindestens zweifach höheres PDAC-Risiko aufwiesen als die Gruppe mit den niedrigsten BCAA-Werten. Eine Unterteilung der Proband\*innen nach dem Zeitpunkt der Probenentnahme ergab, dass das mit erhöhten BCAA-Werten verbundene gesteigerte Risiko 2-5 Jahre vor der Diagnose am höchsten war. Dieser Zeitpunkt ist von besonderem Interesse, da er einen Zeitraum vor dem Auftreten anderer bekannter Indikatoren für Bauchspeicheldrüsenkrebs widerspiegelt. Die Forscher\*innen stellten sogar die Hypothese auf, dass erhöhte BCAA-Werte ein Marker für eine frühe Erkrankung sein könnten. Die Autor\*innen fügten außerdem BCAA-Messungen zu bestehenden Risikostratifizierungsmodellen hinzu, die zur Vorhersage des PDAC-Risikos auf der Grundlage mehrerer objektiver Messgrößen wie Alter, BMI, körperliche Aktivität und Diabetes in der Vergangenheit verwendet werden. Die Hinzufügung von BCAA-Messungen verbesserte die Leistung der Modelle, was darauf hindeutet, dass diese Messgröße selbst ein unabhängiger Risikofaktor für Bauchspeicheldrüsenkrebs ist. Anhand von Mausmodellen mit K-RAS-gesteuerten Tumoren konnten die Forscher\*innen zeigen, dass der BCAA-Plasmaspiegel bei Mäusen mit Bauchspeicheldrüsenkrebs erhöht war, nicht jedoch bei Tumoren in anderen Geweben [208, 222].

In der Women's Health Study (WHS) mit 39.876 US-Frauen zeigte sich über einen Beobachtungszeitraum von über 20 Jahren ein Zusammenhang zwischen BCAAs und Bauchspeicheldrüsenkrebs (74 Fälle) [62]. Insbesondere Isoleucin wies eine

signifikante Verbindung auf, während für die gesamten BCAAs und Leucin nur marginale Zusammenhänge festgestellt wurden. Valin zeigte keine Assoziation. Diese Verbindungen waren bei Frauen mit einem normalen BMI zum Zeitpunkt der Blutabnahme ausgeprägter. Zudem stellten Tobias et al. fest, dass ein höherer Plasma-Isoleucin-Wert mit einem 30% erhöhten Bauchspeicheldrüsenkrebsrisiko verknüpft war, welches bei Personen mit einem normalen BMI zu Studienbeginn sogar verdoppelt war [62].

Die Studie von Shu et al. ist die erste prospektive Metabolomics-Studie, die in der asiatischen Bevölkerung durchgeführt wurde, um die Profile von Blutmetaboliten im Zusammenhang mit dem Bauchspeicheldrüsenkrebsrisiko systematisch zu untersuchen. Für die Metaboliten-Analyse wurden Plasmaproben von 226 neu diagnostizierten Bauchspeicheldrüsenkrebs-Patient\*innen sowie 226 alters- und geschlechtsgematchten Kontrollpersonen verwendet. Die Proben stammten aus zwei prospektiven Kohortenstudien aus Shanghai, China - der Shanghai Women's Health Study und der Shanghai Men's Health Study. Die Studie untersuchte die Assoziation von über 600 Metaboliten im Plasma mit dem Risiko für Bauchspeicheldrüsenkrebs in einer prospektiven Fall-Kontroll-Studie.

Dabei beobachteten sie einen suggestiven positiven Zusammenhang zwischen den BCAA-Werten im Blut und dem Bauchspeicheldrüsenkrebsrisiko [256].

In einer prospektiven Fall-Kontroll-Studie von Katagiri et al. wurden 170 Fälle von neu diagnostiziertem Bauchspeicheldrüsenkrebs mit 340 gesunden Kontrollpersonen aus zwei Kohortenstudien in Japan verglichen. Ein zentraler Bestandteil dieser Studie war die Untersuchung der Plasmakonzentrationen von Leucin, Isoleucin und Valin, die vor der Diagnose gemessen wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass höhere Plasmakonzentrationen von BCAAs mit einem erhöhten Risiko für Bauchspeicheldrüsenkrebs korrelierten. Besonders bei Proband\*innen im höchsten BCAA-Quartil war das Risiko im Vergleich zum niedrigsten Quartil erhöht. Auch nach Berücksichtigung von Faktoren wie BMI, Rauchverhalten und Alkoholkonsum blieb dieser Zusammenhang bestehen. Es wurde festgestellt, dass dieser Zusammenhang bei Teilnehmer\*innen mit einem Intervall von mehr als 10 Jahren zwischen Blutentnahme und Krebsdiagnose stärker

war. Bei einem Intervall von weniger als 10 Jahren war der Zusammenhang nicht signifikant. In weiteren Analysen wurde dieser Zusammenhang bei verschiedenen Subgruppen, darunter Männer und Frauen sowie Raucher und Nichtraucher, festgestellt. Nach dem Ausschluss von Proband\*innen mit einer Diabetes-Diagnose zu Studienbeginn blieb der beobachtete Zusammenhang bestehen [257].

Vorläuferläsionen eines Pankreaskarzinoms sind von besonderem Interesse für die Früherkennung, insbesondere, da Studien zeigen, dass bei ihnen ähnlich wie beim manifesten Karzinom erhöhte BCAA-Spiegel im Plasma auftreten können. Dies weist darauf hin, dass solche biochemischen Veränderungen als potenzielle Marker für die Früherkennung von Pankreaskarzinomen und deren Vorstadien dienen könnten.

Die Studie von Yip-Schneider et al. zielte darauf ab, den Zusammenhang zwischen verschiedenen Biomarkern für IR und dem Dysplasiegrad von IPMN zu untersuchen. Bei der Analyse von 235 Patient\*innen mit IPMN, darunter 166 mit niedrig- bis mittelgradiger Dysplasie und 69 mit hochgradiger Dysplasie oder invasiven Formen, zeigten sich interessante Muster. Die BCAA-Konzentration war bei hochgradigen/invasiven IPMN höher als bei niedriggradigen/mäßiggradigen IPMN. Dieser Unterschied war besonders bei übergewichtigen Patient\*innen signifikant. Andere untersuchte Biomarker wie RBP-4, HbA1c, Adiponektin und c-Peptid zeigten keine klaren Unterschiede zwischen den Gruppen. Der Befund bezüglich BCAAs korreliert mit einer früheren Studie von Mayers et al. [222]. In dieser Studie wurden bei Patient\*innen erhöhte BCAA-Konzentrationen einige Jahre vor der Diagnose eines Pankreaskarzinoms nachgewiesen, was auf das Vorhandensein von Vorläuferläsionen wie IPMN hindeutet. Es wird angenommen, dass diese erhöhten BCAA-Spiegel das Ergebnis eines gesteigerten Abbaus von Gewebeprotein in den frühen Stadien der Entwicklung des Pankreaskarzinoms sein könnten [210].

In früheren Berichten wurden höhere Konzentrationen von Taurin, Glutamat, Laktat, Leucin, Isoleucin und Valin und niedrigere Konzentrationen von Betain als Biomarker in PDAC-Gewebe identifiziert, die auch in der Studie von Wen et al.

beobachtet wurden [258]. Jedoch konnten sie die gleichen Trends bei der Veränderung von PanIN finden, die als Biomarker nicht nur für PDACs, sondern auch für präkanzeröse Läsionen der Bauchspeicheldrüse dienen können [258].

## **3 Diskussion**

### **3.1 Diabetes**

In der wissenschaftlichen Gemeinschaft haben sich Diskussionen um die Rolle von BCAAs in den letzten Jahren intensiviert.

Während diese Aminosäuren historisch betrachtet vor allem für ihre wichtige Rolle in der Muskelproteinsynthese anerkannt wurden, haben neuere Untersuchungen ihre potenzielle Beteiligung an der Regulation des Metabolismus beleuchtet.

Einige Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass BCAAs weit über ihre bekannte Funktion als Proteinbausteine hinausgehen.

Obwohl viele Studien einen Zusammenhang zwischen BCAAs und der Förderung von IR und Diabetes gezeigt haben, gibt es dennoch Untersuchungen, die zu gegenteiligen Schlüssen kommen und positive Auswirkungen auf den Metabolismus hervorheben.

Zahlreiche Untersuchungen haben auf die positiven Auswirkungen von BCAAs, insbesondere von Leucin und Isoleucin, auf den Glukosestoffwechsel hingewiesen [259]. Sie haben gezeigt, dass BCAAs direkt auf Insulin-Zielorgane wie Fettgewebe, Skelettmuskulatur und Leber einwirken [260] und die IR sowie den Glukosespiegel im Plasma verbessern können [120, 261–264]. Es wurde festgestellt, dass eine proteinreiche Ernährung die Glukosekontrolle bei Diabetikern und Prä-Diabetikern steigern kann. Ein Mechanismus dahinter könnte der mTOR-Signalweg und die Wirkung von Leucin sein, welche die Glukoseregulation beeinflussen, indem sie von einer Bauchspeicheldrüsenkontrolle zu einer hepatischen Kontrolle wechseln [265].

Layman et al. haben auch die wichtige Rolle von BCAAs in der Glukoseregulation betont, insbesondere wenn Kohlenhydrate durch Proteine ersetzt werden [266].

Abgesehen von diesen positiven Effekten auf den Glukosestoffwechsel, haben Studien gezeigt, dass BCAAs auch das Körpergewicht und die fettfreie

Körpermasse beeinflussen können. Speziell Leucin scheint die Nahrungsaufnahme zu verringern und das Körpergewicht über mTOR-Signale zu reduzieren [267]. She et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen BCAAs und Fettleibigkeit und fanden heraus, dass gestörte BCAA-Stoffwechselwege zur Verbesserung der Glukosetoleranz und zur Resistenz gegenüber ernährungsbedingter Fettleibigkeit beitragen könnten [79, 268].

Trotz dieser allgemein positiven Ergebnisse gibt es jedoch einige Diskrepanzen. Neben den positiven Effekten auf den Glukosemetabolismus, haben andere Forscher\*innen das Gegenteil festgestellt [269]. Untersuchungen von Newgard et al. [57] und White et al. [270] zeigten zudem, dass die Zugabe von BCAAs zu einer fettreichen Diät die IR verschlimmern kann, während andere Gruppen den Vorteil von BCAA-Beschränkungen auf die Insulinempfindlichkeit hervorhoben [271, 272].

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass BCAAs, insbesondere Leucin, eine Schlüsselrolle bei der Regulierung des Glukosestoffwechsels spielen können. Es ist jedoch offensichtlich, dass weitere Untersuchungen erforderlich sind, um diese Mechanismen vollständig zu verstehen und umstrittene Ergebnisse zu klären.

### **3.1.1 MTOR Wirkung**

In der Diskussion über die Wirkung von BCAAs, insbesondere im Kontext der mTORC1-Aktivierung und IR, gibt es unterschiedliche Ergebnisse. Es wurde beobachtet, dass trotz einer Erhöhung des BCAA-Spiegels – entweder durch Nahrungsergänzung oder genetische Modifikation – der Stoffwechsel verbessert wird, auch wenn die mTORC1-Signalisierung aktiviert ist [268]. Die vorliegenden Daten lassen vermuten, dass bei Mäusen mit eingeschränktem BCAA-Katabolismus erhöhte BCAA-Konzentrationen auf eine gesteigerte Rate des Proteinumsatzes zurückzuführen sind. Dies könnte zu einem erhöhten Energieaufwand führen [149].

Die Unsicherheiten beginnen jedoch, wenn es um geringfügige Schwankungen im BCAA-Spiegel und deren möglichen Einfluss auf die IRS-1/2-Serinphosphorylierung geht. Trotz der Verabreichung höherer Leucin-Dosen in einigen Studien blieben

Fragen offen, ob normale BCAA-Werte tatsächlich die mTOR-Aktivität und Serinphosphorylierung von IRS1 und IRS2 beeinflussen könnten [273]. Es wurde sogar festgestellt, dass proteinreiche Diäten nur kurzfristige Auswirkungen auf die Insulinsensitivität haben und dieser Effekt nach 6 bis 18 Wochen verschwindet, was darauf hindeutet, dass mTORC1 nur bei kurzfristigen BCAA-Schwankungen eine Rolle spielen könnte [149].

Zusätzliche Untersuchungen zeigen gemischte Ergebnisse. Trotz gesenkter BCAA-Werte nach einer Magenbypass-Operation blieb die mTOR-Aktivität konstant [274]. Andere Studien betonten, dass hohe BCAA-Werte in der Ernährung weder die mTOR-Aktivität noch die Insulinsensitivität beeinflussen, es sei denn, die Diät ist reich an Fetten [57, 81]. Mäuse, die BCAAs erhielten, wiesen eine erhöhte mTOR-Aktivität auf, ohne dass dies die Insulinsensitivität beeinflusste [275].

Die Beziehung zwischen mTORC1-Aktivierung und IR ist komplex und wird nicht vollständig verstanden. Dies macht weitere Untersuchungen notwendig.

### **3.1.2 BCAA als Folge/Marker für IR und Diabetes**

Es ist nach wie vor umstritten, ob ein Anstieg der BCAA-Plasmaspiegel die Ursache oder Folge einer IR ist.

Merino et al. zeigten in einer bevölkerungsbezogenen prospektiven Studie mit 1.150 Teilnehmern im Alter von 40 bis 65 Jahren, dass früh auftretende metabolische Veränderungen in der Pathogenese von T2DM auftreten können [276]. Dies wurde durch eine Mendelsche Randomisierungsanalyse, die darauf hindeutete, dass die Erhöhung der BCAAs nach der Entwicklung einer IR auftritt, unterstützt [127].

Um das Risiko für neu auftretenden T2DM einzuschätzen, wurden herkömmliche Risikofaktoren verwendet, wie z.B. Geschlecht, Diabetes-Vorgeschichte der Eltern, Alter, Nüchtern glukose und weitere. Über 20 Jahre hinweg entwickelten 95 dieser Personen T2DM. Es wurden 19 Metaboliten identifiziert, die bei der Vorhersage des Risikos für T2DM nützlich sind und über die herkömmlichen Risikofaktoren hinausgehen [276].

Ein starker Fokus in dieser Debatte liegt auf der Frage, ob der Anstieg der BCAA-Spiegel im Plasma das Ergebnis eines gestörten Stoffwechsels sein könnte. Dies könnte durch eine verminderte Genexpression von BCAT und BCKD verursacht werden, wie in Mäusemodellen festgestellt wurde [101, 127, 277]. Faktoren wie fettreiche Ernährung, Fettleibigkeit oder erhöhte Insulinspiegel könnten zu einem Defekt in der Aktivität und Expression von BCKD in der Leber und in weiterer Folge zu einer Anhäufung von BCAAs oder BCKAs führen [278, 279]. Diese Theorie wird durch das Wissen gestützt, dass BCKAs im Krebszyklus verwendet werden und eine Dysfunktion der BCKD zu einer Anhäufung von BCKA und/oder BCAAs führen. Eine solche Ansammlung könnte den Anstieg der Acylcarnitine (AC) in Zusammenhang mit IR erklären. Acylcarnitine sind ein Nebenprodukt der unvollständigen mitochondrialen Fettsäureoxidation, Acylester von Carnitin, die auch beim Abbau anderer Verbindungen wie BCAAs zu C3- und C5-ACs entstehen können [67].

Eine alternative Hypothese schlägt vor, dass nicht die BCAAs selbst, sondern ein erhöhter Gewebe-Proteinabbau IR und Diabetes verursacht [66, 76, 222]. Körperliche Betätigung, die nachweislich die Insulinempfindlichkeit verbessert, fördert auch den BCAA-Abbau in der Skelettmuskulatur [280]. Aus diesen Belegen lässt sich schließen, dass erhöhte BCAAs oder BCKAs möglicherweise als frühe Marker für T2DM prädestiniert sein könnten.

Es muss jedoch noch geklärt werden, um ein umfassendes Verständnis der Rolle von BCAAs in der IR und T2DM-Pathogenese zu gewinnen.

In der wissenschaftlichen Forschung ist Objektivität und Präzision von entscheidender Bedeutung, um zuverlässige und relevante Ergebnisse zu erzielen. Doch trotz bester Bemühungen und strenger Protokolle können Verzerrungen (Bias) und Störfaktoren in den Ergebnissen auftreten. Diese Verzerrungen können aus einer Vielzahl von Gründen entstehen, von denen einige oft übersehen werden. Einer der häufigsten Gründe für eine solche Verzerrung ist die Auswahl der Studienpopulation. Verschiedene Populationen haben unterschiedliche genetische, kulturelle und soziale Hintergründe, die alle die Ergebnisse beeinflussen können.

Zum Beispiel wurde eine Studie an einer spezifischen Population chinesischer Erwachsener durchgeführt [183]. Diese Tatsache bedeutet, dass die Ergebnisse möglicherweise nicht unbedingt auf andere Bevölkerungsgruppen in verschiedenen Teilen der Welt übertragen werden können.

Ein weiterer kritischer Faktor, der oft zu Verzerrungen führt, ist der Unterschied zwischen Tier- und Menschenmodellen. Eine menschliche Population weist im Vergleich zu Inzuchtmodell unter Laborbedingungen eine deutlich heterogenere Stoffwechsellzusammensetzung auf, bei der Umweltfaktoren, Lebensstil und genetischer Hintergrund die primär beeinflussenden Faktoren darstellen. Während Tiere häufig anders auf bestimmte Behandlungen oder Umweltbedingungen reagieren als Menschen, können Erkenntnisse aus Tierstudien ohne zusätzliche Validierung oder Forschung nicht immer direkt auf den Menschen angewendet werden. Das tiefe Verständnis der physiologischen und biologischen Unterschiede zwischen den beiden ist unerlässlich, um wissenschaftliche Ergebnisse angemessen zu interpretieren.

Menschliche Patient\*innen mit Diabetes zeigen eine Vielfalt von Reaktionen auf ihre Diagnose. Viele passen ihre Ernährungsgewohnheiten an, steigern ihr Maß an körperlicher Betätigung und beginnen mit der Einnahme einer Reihe von antidiabetischen und kardiovaskulären Schutzmedikamenten [281].

Im Kontext einer anderen Studie wurde bspw. nicht berücksichtigt, dass die Teilnehmer\*innen vor der Blutabnahme fasten sollten. Dies könnte bedeutend sein, da der Verzehr von Nahrungsmitteln einige zirkulierende Metaboliten beeinflussen kann. Ein anderer Bias betrifft die Glaubwürdigkeit der Teilnehmer\*innen selbst. Es wurden T2DM-Fälle von den Teilnehmer\*innen selbst gemeldet. Dies könnte zu einer Fehlklassifizierung führen und ist somit als weiterer kritischer Bias-Faktor, der in Betracht gezogen werden muss [183].

Ein spezifisches Limitationsgebiet, das in diesem Zusammenhang relevant ist, betrifft die Gewebevariationen. Die Frage ist, wie man diese Gewebevariationen beim Vergleich von Personen mit unterschiedlichem Gewicht berücksichtigt. Ein Kernproblem ist, wie man den BCAA-Enzym-Gehalt in den Geweben misst, wenn Körpergröße und -struktur variieren [87].

In der wissenschaftlichen Forschung kann die Wahl zwischen Nüchtern- oder Nicht-Nüchtern-Blutproben sowie deren korrekte Entnahme, Handhabung und Lagerung

erhebliche Auswirkungen auf die Ergebnisse haben und zu Bias führen. Ebenso können Unterschiede in der Feststellung von Diabetes und in den für die Metabolomanalyse angewendeten Qualitätskontrollverfahren zwischen verschiedenen Studien zu abweichenden Befunden führen. Daher sollten zukünftige Untersuchungen eine einheitliche Vorgehensweise haben, um die potenziellen Quellen von Heterogenität zu mindern. Es ist unerlässlich, diese möglichen Bias-Quellen zu identifizieren und anzugehen, um die Validität und Zuverlässigkeit von Studienergebnissen sicherzustellen [61].

Die in der Literatur berichteten Wirkungen von Aminosäuren auf die Glukosehomöostase sind äußerst unterschiedlich und reichen von einer Erhöhung der Glukosesensibilisierung bis hin zur Induktion einer IR. Die Wirkungen sind in der Tat in hohem Maße von mehreren Faktoren abhängig, u. a. (aber nicht nur) von den Bestandteilen der verabreichten Therapie, dem Vorhandensein von Insulin oder Lipiden, dem Organ- oder Zelltyp, an dem die Ergebnisse erzielt wurden, und dem Vorhandensein von Grunderkrankungen wie z. B. Hepatitis, Leberzirrhose oder Diabetes [282].

In der Untersuchung potenzieller Biomarker für die Vorhersage des Diabetesrisikos sind zahlreiche Studien zu unterschiedlichen Schlussfolgerungen gelangt. In einer Studie wurde festgestellt, dass Valin zwar ein potenzieller Biomarker für die Vorhersage des Diabetesrisikos sein könnte, er jedoch nicht allein zur Vorhersage von Diabetes herangezogen werden sollte [183]. In anderen Untersuchungen wurde hingegen herausgefunden, dass alle BCAAs zur Vorhersage dienen können [43]. Wieder andere Studien legen nahe, dass nicht die BCAAs selbst, sondern deren Metabolite als Schlüsselindikatoren für das Diabetesrisiko dienen könnten [46]. Die unterschiedlichen Ergebnisse verdeutlichen die komplexe Natur des Themas und betonen die Bedeutung weiterer umfangreicher Forschung, um die genaue Funktion und das Potenzial von BCAAs und ihren Stoffwechselprodukten bei der Vorhersage von Diabetes zu klären.

In der Forschungslandschaft gibt es verschiedene Studiendesigns, von denen jedes seine eigenen Vorteile hat. In der Forschung gibt es oft die Debatte, ob longitudinale Studien Querschnittsstudien vorzuziehen sind. Während Querschnittsstudien Daten zu einem bestimmten Zeitpunkt erfassen, zeichnen sich longitudinale Studien dadurch aus, dass sie Daten über einen längeren Zeitraum hinweg sammeln. Dies

hat den entscheidenden Vorteil, dass Ursache-Wirkungs-Beziehungen besser nachvollzogen werden können, da sich zeitliche Abfolgen und Kausalitäten genauer bestimmen lassen.

Zudem bieten longitudinale Studien die Möglichkeit, individuelle Veränderungen im Laufe der Zeit zu verfolgen. Dies ist besonders wertvoll, wenn untersucht werden soll, wie sich bestimmte Faktoren auf Individuen auswirken. Ein weiterer Vorzug dieser Studienart ist die bessere Kontrolle konfundierender Variablen durch wiederholte Messungen derselben Personen. Und da in longitudinalen Studien oft dieselbe Stichprobe über die Zeit hinweg beobachtet wird, verringert sich die Wahrscheinlichkeit von Auswahlverzerrungen, die in Querschnittsstudien ein Problem darstellen könnten.

Positiv hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang die Studie von Yu et al., bei der es sich um eine longitudinale Studie handelt [183].

Dennoch sind longitudinale Studien nicht frei von Nachteilen. So kann es etwa über die Zeit zum Verlust von Studienteilnehmern kommen. Ebenso können Cohort-Effekte auftreten. Ein Cohort-Effekt tritt auf, wenn Unterschiede zwischen Gruppen auf gemeinsame Erfahrungen einer bestimmten Generation zurückzuführen sind. Personen, die zur gleichen Zeit geboren wurden, können ähnliche Verhaltensweisen oder Einstellungen haben, die sich von anderen Generationen unterscheiden.

Trotz dieser Einschränkungen bieten longitudinale Studien in vielen Forschungskontexten tiefere und genauere Einblicke als ihre querschnittlichen Pendanten. Vor allem wenn es um die Untersuchung von zeitlichen Trends oder die Klärung von Ursache-Wirkungs-Beziehungen geht, sollten sie bevorzugt zum Einsatz kommen.

Fall-Kontroll-Studien sind eine bewährte epidemiologische Methode zur Untersuchung der Faktoren, die bestimmte Krankheiten oder medizinische Zustände beeinflussen können. Sie sind oft kosteneffizienter und zeitsparender im Vergleich zu anderen Designs, gerade weil die Erkrankung in den untersuchten Fällen bereits vorliegt. Dieses Design erlaubt die gleichzeitige Untersuchung mehrerer Risikofaktoren für eine gegebene Krankheit.

Auf der anderen Seite gibt die Querschnittsstudie eine Momentaufnahme in die Prävalenz und Verteilung von Krankheiten oder anderen gesundheitsbezogenen Zuständen zu einem bestimmten Zeitpunkt. Ihre Durchführung ist oft kostengünstiger, da sie nur zu einem spezifischen Zeitpunkt durchgeführt wird. Darüber hinaus zeichnet sie sich durch ihre breite Anwendbarkeit aus und kann auf eine Vielzahl von Gesundheitszuständen angewendet werden, wodurch sie oft als Ausgangspunkt für weitergehende Untersuchungen dient.

Als Beispiel hierfür belegen die Studien von Tai et al. und Huffman et al. den starken und bevorzugten Zusammenhang zwischen dem BCAA-bezogenen Metabolitencluster und der IR in Studien unterschiedlichen Designs (Fall-Kontroll- oder Querschnittsstudien) über mehrere ethnische Gruppen und geografische Regionen hinweg [66, 283].

Die Größe einer Studienpopulation bzw. Stichprobengröße ist entscheidend für die Robustheit und Verlässlichkeit wissenschaftlicher Untersuchungen. Eine größere Stichprobengröße ermöglicht eine präzisere Einschätzung der Ergebnisse und reduziert den Standardfehler. Ein bedeutender Vorteil größerer Stichproben ist die Minderung von Zufallsschwankungen. In kleineren Proben können solche Schwankungen die Resultate erheblich beeinflussen, während sie in größeren Proben durch die Vielzahl der Datenpunkte ausgeglichen werden. Diese erhöhte Stichprobengröße führt auch zu einer höheren statistischen Aussagekraft, wodurch die Fähigkeit einer Studie gesteigert wird echte Effekte zu identifizieren und das Risiko eines übersehenen tatsächlichen Effekts minimiert wird. Des Weiteren gewährleistet eine umfangreiche Stichprobe eine größere Diversität der Teilnehmer und macht dadurch die Ergebnisse für die Gesamtbevölkerung repräsentativer. Ein weiterer Nutzen liegt in der Robustheit der Studienergebnisse: Ausreißer oder extreme Werte haben in größeren Proben einen tendenziell geringeren Einfluss. Die Studie von Rebolz et al. präsentiert einige bemerkenswerte Stärken, die in der Metabolom-Forschung hervorstechen [182]. Ein zentrales Merkmal der Untersuchung ist ihre beeindruckende Stichprobengröße von 2.939 Teilnehmern. Dies hebt sie von vielen anderen Studien in diesem Bereich ab und verleiht den Ergebnissen eine größere Glaubwürdigkeit. Der lange Nachbeobachtungszeitraum

von über 20 Jahren ist ebenfalls bemerkenswert und bietet eine seltene und wertvolle Perspektive auf die Entwicklung von Diabetes über einen ausgedehnten Zeitraum. Durch die prospektive Analyse konnte die Studie wertvolle Einblicke in Stoffwechselanomalien liefern, die lange vor einer Diabetesdiagnose auftreten. Ein weiterer positiver Aspekt ist die Diversität der Studienteilnehmer. Die Einbeziehung sowohl schwarzer als auch weißer Männer und Frauen aus verschiedenen Gemeinden in den USA erweitert die Relevanz der Studienergebnisse und macht sie für eine breitere Bevölkerungsgruppe anwendbar. Insgesamt hebt sich die Studie durch ihre Gründlichkeit, Diversität und methodische Stärke in einem wichtigen Bereich der medizinischen Forschung hervor.

Die Zusammensetzung einer Studienpopulation aus verschiedenen Ethnien ist von entscheidender Bedeutung, um die Generalisierbarkeit und Relevanz wissenschaftlicher Ergebnisse zu gewährleisten. Ethnische Vielfalt in Forschungsstudien sorgt für eine umfassendere und repräsentativere Datenbasis. Dies ist besonders wichtig, da genetische, kulturelle und umweltbedingte Faktoren, die zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen variieren können, die Reaktionen auf Behandlungen oder die Entwicklung bestimmter Erkrankungen beeinflussen können. Ohne diese Diversität können Studienergebnisse unvollständig oder verzerrt sein und nicht auf alle Bevölkerungsgruppen zutreffen.

## **3.2 Krebs Diskussion**

### **3.2.1 Rolle von BCAA auf die Tumorentstehung**

Die Expression von BCAA-abbauenden Enzymen korreliert in zahlreichen Krebsarten mit der Tumorprogression. Ein markantes Beispiel dafür ist das HCC (Hepatozelluläre Karzinom), bei dem eine verringerte Expression mit einer erhöhten Tumorprogression und Aggressivität einhergeht, ähnlich wie bei Krebserkrankungen des Dickdarms und des Rektums, des Magens, der Niere und der Nebennierenrinde [284].

Gleichzeitig wurden hohe Konzentrationen von Enzymen des BCAA-Stoffwechselweges mit Krebswachstum und -überleben in Zusammenhang gebracht. Tatsächlich scheint die verstärkte BCAA-Aufnahme eine charakteristische Eigenschaft bei AML (akuter myeloischer Leukämie) und NSCLC (nicht-kleinzellige

Lungenkarzinome) zu sein, welche die BCAAs als Substrate für die Nukleotidsynthese nutzen [227, 228, 285].

Dennoch ist die Rolle von BCAAs in der Tumorentstehung komplex und variiert je nach Krebsart und genetischer Mutation. PDACs und NSCLCs im Mausmodell nutzen BCAAs unterschiedlich. Während NSCLC-Tumore BCAAs vermehrt aufnehmen, reduzieren PDAC-Tumore ihre BCAA-Aufnahme aus der Mikroumgebung. Ebenso haben Untersuchungen gezeigt, dass die Unterdrückung des Enzyms BCAT1 das Tumorwachstum von PDACs nicht beeinflusst, obwohl hohe Plasma-BCAA-Spiegel und niedrige BCAT1-Spiegel im Tumor vorliegen [227].

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass die genetische Mutation, die dem Krebs zugrunde liegt, den BCAA-Stoffwechsel beeinflussen kann. Dies wurde insbesondere bei PDACs festgestellt, bei dem sich der BCAA-Stoffwechsel je nach vorhandener Chromosomendeletion unterscheidet. Es wurde berichtet, dass der über BCAT2 vermittelte BCAA-Katabolismus, welcher durch die Chromosomendeletion chr18q21 verursacht wird, eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Bauchspeicheldrüsenkrebs spielt [230].

Auffällig ist die zentrale Rolle von BCAT1 im Glutaminstoffwechsel, insbesondere in Bezug auf Bauchspeicheldrüsenkrebs. Obwohl die Expression von BCAT1 in dieser Krebsart gering ist, könnte es aufgrund seiner hohen Interaktion mit anderen Genen ein potenzielles Ziel für therapeutische Ansätze darstellen [225].

Es sollte jedoch betont werden, dass die derzeitige Forschungslage zur Rolle von BCAAs bei der Tumorentstehung nicht abschließend ist. Verschiedene Studien und Modelle können zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Gleichzeitig besteht immer das Risiko von Fehlinterpretationen, insbesondere wenn menschliche Krebsmodelle nicht genau nachgeahmt werden können. Das zeigt auch eine Studie der Gruppe von Neinast et al., in der hervorgehoben wurde, dass die Ergebnisse aus Bauchspeicheldrüsenmodellen möglicherweise nicht direkt auf den Menschen übertragbar sind [286].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass BCAAs und ihr Metabolismus eine wichtige, aber komplexe Rolle in der Tumorentstehung spielen.

### 3.2.2 mTOR-Signalweg als mögliches Therapieziel bei PDAC

Das mTOR-System ist seit langem Gegenstand intensiver Forschung aufgrund seiner zentralen Rolle in der Regulation zellulärer Prozesse. Es ist nicht überraschend, dass dieser Weg auch in der Krebsbiologie und -therapie eine zentrale Rolle spielt. Insbesondere bei PDACs ist die Signalübertragung über das mTOR-System von besonderem Interesse.

Rapamycin-Analoga werden in der Krebstherapie eingesetzt, da der mTOR-Signalweg in Krebszellen oft aktiviert wird [251].

Die therapeutische Nutzung von mTOR-Inhibitoren hat jedoch ihre Herausforderungen.

Die erste Generation, Rapalogs, darunter Rapamycin, Temsirolimus und Everolimus, sind allosterische Inhibitoren, welche von Empfängern von Organtransplantaten und Krebspatient\*innen eingesetzt werden. Da es sich bei den Rapalogs um allosterische Inhibitoren handelt, hemmen sie die Phosphorylierung nur einer Untergruppe von mTORC1-Substraten und sind in der Krebsbehandlung nur begrenzt wirksam. Die Einführung von Temsirolimus durch Pfizer im Jahr 2007 und von Everolimus durch Novartis im Jahr 2009 richtete sich speziell gegen Nierenzellkarzinome [287].

Zur Überwindung der Einschränkungen wurden die zweite und dritte Generation von mTOR-Inhibitoren entwickelt. Die zweite Generation umfasst ATP-kompetitive Inhibitoren, die anscheinend in präklinischen Krebsmodellen effektiver sind als Rapalogs. Die "RapaLink"-Inhibitoren sind mTOR-Inhibitoren der dritten Generation. Sie vereinen die Wirkungsweise von Rapamycin mit der eines ATP-kompetitiven Inhibitors [288].

Das Bedürfnis nach mehr Forschung in diesem Bereich wird durch klinische Studien unterstrichen, in denen die Hemmung von mTORC1 erfolglos war. Das bedeutsame finanzielle und zeitliche Investment in solche Studien fordert ein tieferes Verständnis darüber, wie die Signalübertragung über mTORC1 und mTORC2 zur Tumorentstehung der Bauchspeicheldrüse beiträgt. Die PI3K-mTOR-

Signalübertragung ist ein wichtiger Mediator für onkogenes K-RAS in der Bauchspeicheldrüse [240].

In einigen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Hemmung von mTORC1 bei K-RAS-getriebenen Pankreaskarzinomen vorteilhaft sein könnte [289].

Trotz der erkenntnistheoretischen therapeutischen Bedeutung von K-RAS-Mutationen waren bisherige Versuche, das RAS-Protein zu hemmen mittels direkter K-RAS-Inhibitoren in klinischen Studien nicht erfolgreich und haben sich nicht als therapeutisch wirksam gegen PDACs erwiesen [290].

Direkte Angriffe auf das RAS-Protein sind komplex. Daher könnte die Beeinflussung nachgeschalteter Signalwege von RAS derzeit die effektivste Methode sein.

Das PDAC stellt einen Tumortyp dar, bei dem neoplastische Zellen in einem Umfeld mit begrenzten Nährstoffen und Energiequellen überleben können.

Trotz der energiearmen Umgebung in PDACs werden selten Nekrosen im Tumor beobachtet.

Eine der zentralen Hypothesen im Zusammenhang mit dem Überleben dieser Zellen liegt in der Hyperaktivierung des Akt-Signalwegs. Interessanterweise wurde festgestellt, dass bei PDAC eine bedeutende Anzahl von Fällen durch aktivierende Mutationen des K-RAS-Gens charakterisiert ist. Diese Mutationen könnten die Haupttriebkraft für die AKT-Aktivierung in PDAC-Gewebe sein [290].

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse kann man die Hypothese aufstellen, dass die AKT-Hemmung als therapeutische Strategie für Bauchspeicheldrüsenkrebs die gleichzeitige Hemmung an mehreren Stellen des PI3K-Signalwegs umfassen sollte [251].

Dies lässt vermuten, dass PDAC-Zellen über gewebespezifische Moleküle verfügen könnten, die die Aktivität von AKT hochregulieren und so das Überleben der Tumorzellen in dieser herausfordernden Umgebung unterstützen.

Einer dieser Faktoren könnte BRSK2 sein, eine Serin/Threonin-Proteinkinase der AMPK-Familie. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass BRSK2 durch

Nährstoffentzug in PDAC-Zellen induziert wird und dann in der Lage ist, die mTORC1-Aktivität durch die Phosphorylierung des TSC2 zu hemmen. Interessanterweise führt diese Hemmung von mTORC1 in PDAC-Zellen zu einer gesteigerten AKT-Aktivität, indem die Rückkopplungshemmung von AKT durch mTORC1 verloren geht. Diese Daten legen nahe, dass BRSK2 den PDAC-Zellen einen Überlebensvorteil in einer nährstoffarmen Umgebung bieten könnte und ihre Invasivität verstärkt. In Übereinstimmung mit früheren BRSK2-bezogenen Daten kann postuliert werden, dass die Hochregulierung von BRSK2 in PDAC-Zellen die Aktivität von AKT durch Hemmung von mTORC1 verstärken könnte. Die genaue Rolle von BRSK2 und sein Zusammenspiel mit anderen Molekülen in diesem Prozess erfordert jedoch weitere Untersuchungen.

Die Komplexität der Signalwege und molekularen Mechanismen, die das Überleben von PDAC-Zellen in einer energiearmen Umgebung ermöglichen, wird dadurch unterstrichen. Während die Rolle von mTOR und seinen assoziierten Molekülen wie AKT und BRSK2 klar ist, erfordert das vollständige Verständnis dieses Netzwerks und seine therapeutische Ausnutzung weitere Studien und Entdeckungen.

Die genaue Identifizierung und Charakterisierung dieser gewebespezifischen Moleküle und ihre Rolle in der PDAC-Pathologie bleibt ein spannendes Forschungsfeld [290].

Wirkstoffe, die auf mTORC1 und mTORC2 abzielen, haben eine höhere klinische Wirksamkeit gezeigt. Dies unterstreicht die Bedeutung der AKT-Hemmung für das Überleben von Tumorzellen. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von PDA-Zellen mit INK128, einem mTORC1/2-Inhibitor, zu einem fast vollständigen Verlust der mTORC1-Signalübertragung (pS6 und 4EBP1) und einer Unterdrückung der mTORC2-Signalübertragung (phosphoryliertem AKT) führt [291].

PI3K-Inhibitoren wurden für klinische Versuche entwickelt, doch der Signalweg interagiert mit vielen anderen Signalen und es gibt mehrere Rückkopplungsschleifen, die es schwierig machen, die Auswirkungen einer Unterdrückung des Signalwegs vorherzusagen [292].

Es besteht jedoch die Hoffnung, dass die doppelte Hemmung von PI3K-mTOR zu einer Unterbrechung der PI3K-AKT-mTORC1-Signalübertragung führen könnte. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass in einigen der untersuchten PDAC-Modellen ein deutliches Ansprechen auf die Kombination von mTORC1/TORC2-Inhibition mit PI3K-Inhibition erfolgt [293]. Folgerichtig war die Kombination eines dualen mTORC1/TORC2-Inhibitors (AZD2014) mit einem PI3K-Inhibitor (AZD8186; es wurde vorgeschlagen, dass es sich um einen PI3K $\beta$ -Inhibitor handelt) in dem oben erwähnten PDAC-in-vivo-Modell aktiv [240].

Die Bedeutung von mTORC2 wurde durch den Nachweis unterstrichen, dass die genetische Deletion der mTORC2-Komponente Rictor die Tumorentstehung der Bauchspeicheldrüse signifikant unterdrückt. Diese Befunde legen nahe, dass die mTORC2-Signalübertragung eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung der Bauchspeicheldrüse spielt. Die Daten deuten darauf hin, dass ein duales Targeting von mTOR als potenzielle Behandlungsstrategie bei PDACs in Erwägung gezogen werden sollte [240].

IGF-1R ist ein Zelloberflächenrezeptor, der eine entscheidende Rolle beim Zellwachstum, der Differenzierung und dem Überleben spielt. Er ist an der Regulierung verschiedener zellulärer Prozesse beteiligt, einschließlich Stoffwechsel, Proliferation und Apoptose. Bei Pankreasadenokarzinom ist IGF-1R überexprimiert und diese Überexpression wird hauptsächlich über einen Signalweg über mTOR reguliert. Das Vorhandensein von IRS-2 ist erforderlich, um PKC- $\delta$  durch IGF-1R zu aktivieren, welches eine Schlüsselrolle in diesem Weg spielt. Allerdings könnte das Blockieren des IGF-1R-Signalwegs mit neutralisierenden Antikörpern oder einem spezifischen Kinase-Inhibitor gegen IGF-1R möglicherweise die Rezeptorexpression in Pankreaskrebszellen blockieren [250].

Eine andere Arbeit stellte fest, dass die Ausschaltung von Sestrin2 das Wachstum von Bauchspeicheldrüsenkrebs in vivo hemmen kann. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Sestrin2 das Auftreten und die Entwicklung von Bauchspeicheldrüsenkrebs durch mTOR-Signale fördern kann [246].

Metformin ist ein oral einzunehmendes Medikament, das hauptsächlich zur Behandlung von Typ-2-Diabetes eingesetzt wird. Es gehört zur Klasse der Biguanide. Es gibt Analysen, die Metformin als Krebsmedikament untersucht haben. Dabei greift es in den mTOR-Signalweg ein.

Es beeinflusst gleichzeitig AMPK und mTORC1 und verschiebt den Stoffwechsel in Richtung Katabolismus. Dies kann zu gesundheitsfördernden Effekten, ähnlich denen einer gesunden Diät, führen. Dies könnte zu einer reduzierten Krebsrate und einer längeren Lebenserwartung beitragen. Wegen der wichtigen Rolle von AMPK und mTORC1 in der menschlichen Physiologie und der Sicherheit von Metformin sind die therapeutischen Möglichkeiten von Metformin, allein oder in Kombination mit anderen Medikamenten wie mTOR-Inhibitoren, besonders relevant [294].

Es gibt weitere Signalwege, die im Rahmen der Tumorentstehung eines Pankreaskarzinoms auftreten und die als mögliches therapeutisches Ziel in Frage kommen.

In verschiedenen Mausmodellen wurde beobachtet, dass die duale Hemmung von MEK und PI3K die mTOR-Aktivierung reduziert und somit die Apoptose von Krebszellen bei PDACs induziert [295].

In Mausmodellen mit Lungenkrebs wurde eine starke synergistische Aktivität beobachtet, wenn Inhibitoren des PI3K-Signalwegs mit Inhibitoren der RAF-MEK-ERK-Kaskade kombiniert werden [296].

Obwohl Monotherapien mit MEK- oder PI3K-Inhibitoren nur eine geringe Hemmung des Tumorwachstums zeigten, ergab die Kombination beider Behandlungen einen deutlichen Überlebensvorteil. Diese kombinierte Hemmung von MEK und AKT zeigte ebenfalls synergistische Effekte in PDAC-Zelllinien. Es gibt zahlreiche klinische Studien zur kombinierten Hemmung von PI3K und RAF. Ein innovativer Ansatz kombiniert diese Hemmung in einer einzigen Verbindung, die ein Hybrid aus einem Pan-PI3K-Inhibitor und einem MEK-Inhibitor ist. Dieser Ansatz zeigte in PANC-1-Zellen (Pankreaskrebs-Zelllinien) eine wirksame dosisabhängige Abnahme von phosphoryliertem ERK und AKT. Während die Therapie noch optimiert werden muss, stellt sie einen vielversprechenden Rahmen für eine kombinierte Einzelverbindungstherapie dar [218].

Man kann festhalten, dass in der komplexen Entstehung des Pankreaskarzinoms viele Signalwege involviert sind, die viele mögliche Ansatzpunkte einer Therapie

darstellen. Es gilt als vielversprechend, weitere Forschung auf diesem Gebiet zu betreiben.

### **3.2.3 BCAAs als Marker**

Einige Studien haben bereits einen veränderten BCAA-Stoffwechsel bei Krebspatient\*innen beobachtet.

Die von Mayers et al. veröffentlichte Studie liefert Hinweise darauf, dass der Serumspiegel der BCAAs etwa 2-5 Jahre vor der Entstehung von Pankreaskrebs erhöht ist. Dies legt nahe, dass erhöhte BCAA-Spiegel einen unabhängigen Risikofaktor für Pankreaskrebs darstellen könnten. Interessanterweise kehren diese BCAA-Spiegel innerhalb von 2 Jahren vor der offiziellen Krebsdiagnose wieder auf normale Werte zurück. Mausstudien bestätigten zudem, dass diese Erhöhung der BCAAs lediglich temporärer Natur ist. [222].

Diese Erkenntnisse sind insofern von Bedeutung, als dass metabolische Veränderungen bereits in der präkanzerösen Phase oder in sehr frühen Stadien des Pankreaskrebs Veränderungen in den systemischen Aminosäureprofilen und insbesondere in den BCAA-Konzentrationen im Plasma hervorrufen können.

Die Bedeutung der in dieser Studie verwendeten Methode liegt in ihrer prospektiven Herangehensweise. Während viele Biomarker-Studien sich auf Querschnittsdesigns stützen und Proben nur nach der Diagnose entnehmen, wurden in dieser Studie Proben verwendet, die Jahre vor der Krebsdiagnose gesammelt wurden. Das hat den Vorteil, dass man nicht von den unspezifischen Auswirkungen der Krankheit im Spätstadium beeinflusst wird, wie z. B. Entzündungen, Diabetes, Infektionen und Organversagen. Es konzentriert sich also auf die frühesten Manifestationen von PDACs, wobei auch Kontrollen für bekannte Risikofaktoren wie Diabetes vorgenommen wurden. Interessanterweise wurde eine Korrelation zwischen erhöhten BCAA-Spiegeln und dem PDAC-Risiko festgestellt, die unabhängig von anderen mit Diabetes assoziierten Faktoren ist.

Durch die Untersuchung von BCAA-Werten bei Mäusen mit spezifischen Mutationen, die typisch für PDACs sind, konnte festgestellt werden, dass die Erhöhung der BCAAs präneoplastischen Läsionen vorausging, jedoch nicht dem

Adenokarzinom. In anderen experimentellen Modellen wurde festgestellt, dass die BCAA-Erhöhung vor typischen Krankheitssymptomen wie Gewichtsverlust und Anorexie auftrat, was darauf hinweist, dass Diabetes nicht der auslösende Faktor für die BCAA-Erhöhung ist.

Es wurde auch festgestellt, dass Tumore anderer Art nicht zu erhöhten BCAA-Spiegeln führen. Dies deutet auf eine spezifische Reaktion des Pankreas hin.

Ein bemerkenswerter Aspekt von BCAAs ist, dass ihr Spiegel nicht primär von der Leber reguliert wird. Vielmehr wird er durch Ernährung, Nutzung in Geweben und Proteinabbau beeinflusst.

Untersuchungen an Mäusen haben gezeigt, dass die Quelle der erhöhten BCAAs wahrscheinlich von den Proteinspeichern des Gewebes stammt.

Dabei ist zu berücksichtigen, dass ein Anstieg der BCAAs im Blutkreislauf auch ein Indikator für einen hohen Proteinumsatz und Muskelabbau sein kann, beides Kennzeichen der Krebskachexie, die bei vielen PDAC-Patient\*innen beobachtet wird [297].

Die Frage, die sich anschließend stellt, ist, ob diese erhöhten BCAA-Konzentrationen lediglich ein Nebenprodukt pathologischer Prozesse sind oder ob sie das Wachstum und Fortschreiten des Tumors beeinflussen. Mayers et al. ziehen Parallelen zum Muskelkatabolismus während des Hungerns, bei dem Muskelprotein abgebaut wird, um Aminosäuren, insbesondere Alanin und Glutamin, freizusetzen [222].

Einen positiven Zusammenhang zwischen zirkulierenden BCAAs und auftretenden Krebserkrankungen der Bauchspeicheldrüse konnten auch Tobias et al. feststellen [62]. Der Zusammenhang zwischen BCAAs und Pankreaskarzinomen wurde jedoch abgeschwächt und war nicht mehr signifikant, wenn Krebserkrankungen, die innerhalb von 5 Jahren nach der Blutentnahme diagnostiziert wurden, ausgeschlossen wurden. Dies deutet darauf hin, dass erhöhte BCAA-Werte bei Bauchspeicheldrüsenkrebs das Ergebnis eines krebsbedingten Proteinabbaus im Gewebe sein könnten. In der Studie wurde auch erwähnt, dass Leucin und Isoleucin in einer gepoolten, verschachtelten Fallkontrollanalyse als die stärksten Metabolitenprädiktoren für das Auftreten eines pankreatischen Adenokarzinoms

identifiziert wurden. Weitere Forschungen und Replikationen sind erforderlich, um die Rolle von BCAAs bei der Entstehung von Bauchspeicheldrüsenkrebs besser zu verstehen. Diese Analyse zeichnet sich durch ihre umfassende prospektive Studienmethode aus, bei der Metaboliten und Krebsfälle vorausschauend bewertet wurden. Sie ermöglichte die Untersuchung von BCAAs im Kontext verschiedener Krebsarten. Durch die langfristige Nachbeobachtung konnte die Validität der Studie beibehalten und der Einfluss nicht diagnostizierter Krebserkrankungen minimiert werden. Die Analyse berücksichtigte auch validierte Lebensstilfaktoren und Adipositas bezogene Komorbiditäten. Einschränkungen der Analyse sind die fehlenden wiederholten Messungen, da nur einmalige Blutproben entnommen wurden. Dies kann zu möglichen Fehlern führen. Weitere Bedenken sind die Ungenauigkeit des BMI bei der Erfassung abdominaler Fettverteilung und die Möglichkeit, dass die Ergebnisse für standortspezifische Krebserkrankungen nicht robust genug sind. Obwohl BCAAs mit anderen Metaboliten korreliert sein könnten, beeinflussten zusätzliche Biomarker die Ergebnisse nicht signifikant [62].

Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch eine Studie aus Japan, in der aber ausschließlich Leucin eine Korrelation mit Pankreaskarzinomen zeigte [257].

Demgegenüber steht die Studie von Fukutake et al. in der die freien Plasma-Aminosäuren-Profile (PFAA) von diagnostizierten Patient\*innen nach der Krebserkennung durch diagnostische Bildgebung vorgestellt wurden. Bei Patient\*innen mit einer Erkrankung im resektablen Stadium (bis zum Stadium IIB) gab es keine signifikanten Veränderungen der BCAA-Konzentrationen im Vergleich zu Kontrollpersonen. Bei Patient\*innen mit fortgeschrittenem Krebs waren die Leucin- und Valin-Konzentrationen verringert. In der Studie wurden Merkmale von Pankreaskarzinom-Phasen identifiziert, die durch die derzeit verfügbaren bildgebenden Verfahren leicht bestätigt werden können; daher ist es möglich, dass sich diese Merkmale zwischen den Hauptstadien des Mikrokarzinoms oder vor dem Beginn der Karzinogenese unterscheiden. Daher könnten die beobachteten Veränderungen in den PFAA-Profilen der Patient\*innen mit Pankreaskarzinom-Läsionen, die in der Studie mittels Bildgebung diagnostiziert und für eine Resektion in Betracht gezogen werden konnten, auch durch systemische metabolische Veränderungen verursacht worden sein [298].

### **3.2.4 Marker für Vorläuferläsionen**

Die Forschung hat das Potenzial verschiedener Biomarker zur Vorhersage des Risikos für Pankreaskarzinom, durch Vorläuferläsionen wie das IPMN, ergründet. BCAAs beispielsweise könnten nützliche nicht-invasive Marker für das Malignitätsrisiko von IPMN darstellen, insbesondere in Kombination mit klinischen Daten. Allerdings müssen solche Studienergebnisse mit Vorsicht betrachtet werden, insbesondere aufgrund der begrenzten Natur von Querschnittsstudien und der Einschränkung, dass die Patient\*innenproben aus einer einzelnen Klinik stammten [210].

Die Beobachtungen, dass höhere Konzentrationen von Taurin, Glutamat, Laktat, Leucin, Isoleucin und Valin und niedrigere Konzentrationen von Betain in PDAC-Gewebe gefunden wurden, stärken diese Annahme [299, 300]. Die gleichen Trends wurden auch bei der Veränderung von PanIN festgestellt, was darauf hindeutet, dass sie nicht nur als Biomarker für PDACs, sondern auch für präkanzeröse Läsionen der Bauchspeicheldrüse dienen können [258].

Es ist allerdings wichtig, die Rolle der individuellen Körperzusammensetzung und des Stoffwechsels bei der Bestimmung der Leptin- und BCAA-Spiegel zu berücksichtigen. Die zeitlichen Veränderungen dieser Biomarker bei einem einzelnen Patienten könnten eine bessere Reflektion des Dysplasie-Fortschritts bieten. Einschränkungen, wie z. B. das Querschnittsdesign und die Gewinnung von Proben aus einer einzigen Einrichtung, sollten bei der Bewertung solcher Ergebnisse berücksichtigt werden.

Die Erkenntnisse zeigen, dass zirkulierendes Leptin und BCAAs als vielversprechende nicht-invasive Biomarker für maligne IPMN in Betracht gezogen werden könnten. Die longitudinale Überwachung dieser Biomarker in Verbindung mit klinischen Daten könnte eine genauere präoperative Risikostratifizierung von Patient\*innen mit IPMN ermöglichen [210]. Dennoch sollten größere, prospektive Studien durchgeführt werden, um die vorläufigen Ergebnisse zu validieren und eine robustere Evidenzbasis zu schaffen.

Der wissenschaftliche Diskurs in diesem Bereich wird durch anderen Studien gefördert, da die Ergebnisse einiger Studien nicht reproduzierbar waren. Dies wirft Fragen hinsichtlich der Zuverlässigkeit und Generalisierbarkeit dieser Befunde auf.

Die Ergebnisse von Katagiri et al. an Japanern [257] und Mayers et al. an europäischen Nachkommen [222] konnten in der Studie von Li Jiao et al. nicht beobachtet werden [301].

So stellten auch He et al. einen Rückgang der BCAAs bei Pankreaskrebspatient\*innen im Vergleich zu Kontrollpersonen fest. Dies könnte darauf hinweisen, dass der Verbrauch dieser Aminosäuren steigt, sobald sich der Krebs entwickelt [302].

In der Studie von Fest et al. konnten die vorherigen Ergebnisse, dass Valin, Leucin und Isoleucin als potenzielle prognostische Biomarker dienen könnten, nicht reproduziert werden [303].

Die Schwierigkeit, die Ergebnisse anderer Studien mit ähnlichem Design und Stichprobengröße zu reproduzieren, deutet auf potenzielle Probleme in den Untersuchungsmethoden hin. Divergente Ergebnisse können auch durch Unterschiede in den Messplattformen oder in den untersuchten Populationen entstehen. Es könnte ebenfalls andere unkontrollierte Variablen geben, die einen Einfluss haben könnten, wie beispielsweise Ernährungsgewohnheiten der Studienteilnehmer\*innen.

Darüber hinaus könnten die BCAA-Konzentrationen auch andere Faktoren reflektieren, wie die Geschwindigkeit der BCAA-Oxidation, der IR oder in einigen Fällen den Katabolismus der Skelettmuskulatur [286].

### **3.3 Abschlussbetrachtung**

#### **3.3.1 Diabetes**

Die Beziehung zwischen BCAAs und Diabetes hat in der wissenschaftlichen Gemeinschaft erhebliches Interesse geweckt. Dies ist insbesondere aufgrund der Vielzahl von Studien der Fall, die zum Teil widersprüchliche Ergebnisse präsentiert haben. Das Feld der BCAA-Forschung ist komplex, da es Studien gibt, die sowohl

die potenziell positiven als auch die negativen Aspekte von BCAAs in Bezug auf den Stoffwechsel beleuchten. Dies betont die Notwendigkeit weitere Forschung zu betreiben.

Ein Kernthema der Diskussion ist die Frage, ob BCAAs tatsächlich eine Ursache für IR sind oder eher eine Folge dieses Zustands. Die Antwort auf diese Frage hat weitreichende Folgen für mögliche therapeutische Interventionen und präventive Strategien. Einige Studien schlagen vor, dass Metaboliten von BCAAs möglicherweise bessere Prädiktoren für IR sind. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Mechanismen, durch die BCAAs den Stoffwechsel beeinflussen, noch komplizierter sind als bisher angenommen.

Einige Forschungsergebnisse legen nahe, dass BCAAs in Kombination mit anderen Aminosäuren prädiktiv für Diabetes sein können, während andere Studien dies in Frage stellen. Dies unterstreicht die Notwendigkeit eines integrierten Ansatzes bei der Untersuchung ihrer metabolischen Effekte. Darüber hinaus bleibt die Rolle einzelner BCAAs in Bezug auf Diabetes umstritten. Während einige Studien einzelne BCAAs als Hauptfaktoren zur Risikovorhersage hervorheben, bevorzugen andere einen umfassenderen Ansatz.

Es wurden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen, wie BCAAs die IR und den Typ-2-Diabetes beeinflussen können. Diese Mechanismen variieren von direkten Einflüssen auf die Insulinsignalübertragung bis zu möglichen Verbindungen zu Entzündungsprozessen.

Trotz der Uneinigkeit in der BCAA-Forschung ist es ermutigend, dass sowohl Querschnitts- als auch Längsschnittstudien durchgeführt wurden. Dies gibt der wissenschaftlichen Gemeinschaft die Möglichkeit, die Beziehung über einen längeren Zeitraum zu betrachten. Die Robustheit der Forschung wird durch Studien mit großen Stichprobengrößen und einer diversen Auswahl an Probanden, einschließlich unterschiedlicher Geschlechter und Ethnien, weiter gestärkt.

Zusammenfassend unterstreicht die laufende Debatte über BCAAs und Diabetes sowohl die Komplexität des menschlichen Stoffwechsels als auch das Erfordernis, in der Forschung vielfältige Ansätze und Methoden zu nutzen. Es ist offensichtlich,

dass weitere, gut durchdachte Studien erforderlich sind, um die komplexe Beziehung zwischen BCAAs und Diabetes zu klären.

### **3.3.1 Pankreaskarzinom**

In Bezug auf BCAAs als potenzielle Biomarker für Pankreaskarzinome ist die wissenschaftliche Literatur weiterhin geteilt. Es gibt eine Diskrepanz in der Literatur, wobei einige Studien erhöhte BCAA-Spiegel bei Pankreaskarzinompatient\*innen feststellten, während andere keine Unterschiede feststellten oder über einen Rückgang berichteten. Einige Studien weisen auf eine Korrelation zwischen erhöhten BCAA-Spiegeln und einem erhöhten Krebsrisiko hin.

Es ist bemerkenswert, dass trotz einiger Hinweise aus diesen Studien, die erhöhte BCAA-Spiegel in der Frühphase der Krebsentwicklung zeigten, bei der Diagnose keine Unterschiede beobachtet wurden. Die BCAA-Spiegel scheinen also in der frühen Phase der Krebsentwicklung zu steigen, kehren jedoch bei der Diagnose des Krebses zur Norm zurück.

Trotz dieser Unklarheiten weisen die Daten darauf hin, dass BCAAs möglicherweise als Früherkennungsmarker für PDACs dienen und sogar in der Überwachung und Prognose der Krankheit eine Rolle spielen könnten. Die Untersuchung anderer Metaboliten, wie Glycerophospholipide, könnte ebenfalls wertvoll sein, wie in der Studie von Shu et al. vorgeschlagen wurde [256].

Es ist jedoch entscheidend zu betonen, dass die Ergebnisse, insbesondere im Hinblick auf BCAAs als Biomarker, in weiteren Studien validiert und in größeren diversifizierten Patient\*innenpopulationen bestätigt werden müssen. Es bedarf insbesondere weiterer Forschung, um die genauen Mechanismen und Zusammenhänge zwischen mTOR, BCAAs und anderen relevanten Faktoren vollständig zu verstehen.

Die mTOR-Signaltransduktion spielt eine zentrale Rolle in der Tumorgenese des Pankreas und beeinflusst maßgeblich das aggressive Verhalten und Fortschreiten von Pankreaskarzinomen. Dies hebt die Notwendigkeit hervor, den mTOR-Signalweg genauer zu verstehen, um therapeutische Angriffspunkte zu identifizieren. In dieser Hinsicht bieten mTOR-Inhibitoren und die Hemmung ihrer

nachgeschalteten Effektoren vielversprechende Ansätze zur Behandlung von Pankreaskarzinomen. Die Komplexität und Heterogenität von Tumoren erfordert eine tiefgreifende Untersuchung und Anpassung der Therapien. Um die PDAC-Behandlung jedoch wirksamer zu gestalten, sind eine genauere Erforschung und Entwicklung neuer Generationen von Inhibitoren erforderlich.

Das Resümee der Erkenntnisse dieser Arbeit zeigt vielversprechende Wege für die Prävention, Diagnose und Behandlung von Pankreaskarzinomen auf. Es bleibt jedoch eine dringende Aufgabe, diese Erkenntnisse durch umfangreiche Untersuchungen weiter zu vertiefen und in klinischen Anwendungen zu bestätigen.

## 4 Literaturverzeichnis

1. Wu G (2013) Amino Acids: Biochemistry and Nutrition. CRC Press
2. Dimou A, Tsimihodimos V, Bairaktari E (2022) The Critical Role of the Branched Chain Amino Acids (BCAAs) Catabolism-Regulating Enzymes, Branched-Chain Aminotransferase (BCAT) and Branched-Chain  $\alpha$ -Keto Acid Dehydrogenase (BCKD), in Human Pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences* 23:4022
3. Podebrad F, Heil M, Reichert S, Mosandl A, Sewell AC, Böhles H (1999) 4,5-Dimethyl-3-hydroxy-2[5H]-furanone (sotolone) — The odour of maple syrup urine disease. *J Inher Metab Dis* 22:107–114
4. Maple Syrup Urine Disease (Branched-Chain Ketoaciduria). In: McGraw Hill Medical.  
<https://ommbid.mhmedical.com/content.aspx?bookId=2709&sectionId=225084607>  
. Accessed 30 Aug 2023
5. Papadopoli D, Boulay K, Kazak L, Pollak M, Mallette FA, Topisirovic I, Hulea L (2019) mTOR as a central regulator of lifespan and aging. *F1000Res*.  
<https://doi.org/10.12688/f1000research.17196.1>
6. Naraev BG, Strosberg JR, Halfdanarson TR (2012) Current Status and Perspectives of Targeted Therapy in Well-Differentiated Neuroendocrine Tumors. *OCL* 83:117–127
7. Zou Z, Tao T, Li H, Zhu X (2020) mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: progress and challenges. *Cell Biosci*.  
<https://doi.org/10.1186/s13578-020-00396-1>
8. Fluhner R, Hampe W (eds) (2019) *Biochemie hoch2 ClinicalKey Edition*. Urban & Fischer
9. Moberg M, Apró W, Ekblom B, van Hall G, Holmberg H-C, Blomstrand E (2016) Activation of mTORC1 by leucine is potentiated by branched-chain amino acids and even more so by essential amino acids following resistance exercise. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 310:C874–C884
10. Liu KA, Lashinger LM, Rasmussen AJ, Hursting SD (2014) Leucine supplementation differentially enhances pancreatic cancer growth in lean and overweight mice. *Cancer Metab* 2:6

11. Zhang Y, Zhang J, Wang S (2021) The Role of Rapamycin in Healthspan Extension via the Delay of Organ Aging. *Ageing Research Reviews* 70:101376
12. Saber-Moghaddam N, Nomani H, Sahebkar A, Johnston TP, Mohammadpour AH (2019) The change of immunosuppressive regimen from calcineurin inhibitors to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors and its effect on malignancy following heart transplantation. *International Immunopharmacology* 69:150–158
13. Kim Y, Lee JS, Joo YH (2020) Rapamycin increases the incidence of neuropsychiatric illness in kidney transplant patients through the suppression of neural stem cells. *Transl Psychiatry* 10:1–8
14. Melnik BC (2015) The Pathogenic Role of Persistent Milk Signaling in mTORC1- and Milk-MicroRNA-Driven Type 2 Diabetes Mellitus. *Curr Diabetes Rev* 11:46–62
15. Lieberthal W, Levine JS (2009) The role of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 20:2493–2502
16. Han JM, Jeong SJ, Park MC, Kim G, Kwon NH, Kim HK, Ha SH, Ryu SH, Kim S (2012) Leucyl-tRNA Synthetase Is an Intracellular Leucine Sensor for the mTORC1-Signaling Pathway. *Cell* 149:410–424
17. Anthony JC, Yoshizawa F, Anthony TG, Vary TC, Jefferson LS, Kimball SR (2000) Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *J Nutr* 130:2413–2419
18. Guo K, Yu Y-H, Hou J, Zhang Y (2010) Chronic leucine supplementation improves glycemic control in etiologically distinct mouse models of obesity and diabetes mellitus. *Nutr Metab (Lond)* 7:57
19. Johnson MA, Gannon NP, Schnuck JK, Lyon ES, Sunderland KL, Vaughan RA (2018) Leucine, Palmitate, or Leucine/Palmitate Cotreatment Enhances Myotube Lipid Content and Oxidative Preference. *Lipids* 53:1043–1057
20. Garlick PJ (2005) The role of leucine in the regulation of protein metabolism. *J Nutr* 135:1553S–6S
21. Nair KS, Short KR (2005) Hormonal and signaling role of branched-chain amino acids. *J Nutr* 135:1547S–52S

22. Biswas D, Dao KT, Mercer A, Cowie AM, Duffley L, Hiani YE, Kienesberger PC, Pulinilkunnil T (2020) Branched-chain ketoacid overload inhibits insulin action in the muscle. *Journal of Biological Chemistry* 295:15597–15621
23. Wang Q, Holst J (2015) L-type amino acid transport and cancer: targeting the mTORC1 pathway to inhibit neoplasia. *Am J Cancer Res* 5:1281–1294
24. Lieu EL, Nguyen T, Rhyne S, Kim J (2020) Amino acids in cancer. *Exp Mol Med* 52:15–30
25. Fukuhara D, Kanai Y, Chairoungdua A, Babu E, Bessho F, Kawano T, Akimoto Y, Endou H, Yan K (2007) Protein Characterization of Na<sup>+</sup>-Independent System L Amino Acid Transporter 3 in Mice. *Am J Pathol* 170:888–898
26. Lorin S, Tol MJ, Bauvy C, Strijland A, Poüs C, Verhoeven AJ, Codogno P, Meijer AJ (2013) Glutamate dehydrogenase contributes to leucine sensing in the regulation of autophagy. *Autophagy* 9:850–860
27. Lahiri V, Hawkins WD, Klionsky DJ (2019) Watch what you (self-) eat: Autophagic mechanisms that modulate metabolism. *Cell Metab* 29:803–826
28. Son SM, Park SJ, Lee H, Siddiqi F, Lee JE, Menzies FM, Rubinsztein DC (2019) Leucine Signals to mTORC1 via Its Metabolite Acetyl-Coenzyme A. *Cell Metab* 29:192-201.e7
29. Ho A, Cho C-S, Namkoong S, Cho U-S, Lee JH (2016) Biochemical Basis of Sestrin Physiological Activities. *Trends in Biochemical Sciences* 41:621–632
30. D’Hulst G, Soro-Arnaiz I, Masschelein E, et al (2020) PHD1 controls muscle mTORC1 in a hydroxylation-independent manner by stabilizing leucyl tRNA synthetase. *Nat Commun*. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13889-6>
31. Ardestani A, Lypse B, Kido Y, Leibowitz G, Maedler K (2018) mTORC1 Signaling: A Double-Edged Sword in Diabetic  $\beta$  Cells. *Cell Metabolism* 27:314–331
32. Meric-Bernstam F, Gonzalez-Angulo AM (2009) Targeting the mTOR Signaling Network for Cancer Therapy. *J Clin Oncol* 27:2278–2287
33. Saxton RA, Sabatini DM (2017) mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 168:960–976
34. Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN (2006) TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell* 124:471–484
35. Chung J, Bauer DE, Ghamari A, et al (2015) The mTORC1/4E-BP pathway coordinates hemoglobin production with L-leucine availability. *Sci Signal* 8:ra34

36. Efeyan A, Zoncu R, Chang S, Gumper I, Snitkin H, Wolfson RL, Kirak O, Sabatini DD, Sabatini DM (2013) Regulation of mTORC1 by the Rag GTPases is necessary for neonatal autophagy and survival. *Nature* 493:679–683
37. Kim D-H, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM (2002) mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110:163–175
38. Jaafar R, Tran S, Shah AN, et al mTORC1-to-AMPK switching underlies  $\beta$  cell metabolic plasticity during maturation and diabetes. *J Clin Invest* 129:4124–4137
39. Leff T (2003) AMP-activated protein kinase regulates gene expression by direct phosphorylation of nuclear proteins. *Biochem Soc Trans* 31:224–227
40. da Silva Xavier G, Leclerc I, Varadi A, Tsuboi T, Moule SK, Rutter GA (2003) Role for AMP-activated protein kinase in glucose-stimulated insulin secretion and preproinsulin gene expression. *Biochem J* 371:761–774
41. Schmelzle T, Hall MN (2000) TOR, a Central Controller of Cell Growth. *Cell* 103:253–262
42. National Task Force on the Prevention and Treatment of Obesity (2000) Overweight, obesity, and health risk. *Arch Intern Med* 160:898–904
43. Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, et al (2011) Metabolite Profiles and the Risk of Developing Diabetes. *Nat Med* 17:448–453
44. Mamas M, Dunn WB, Neyses L, Goodacre R (2011) The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease. *Arch Toxicol* 85:5–17
45. Ramli AS, Selvarajah S, Daud MH, et al (2016) Effectiveness of the EMPOWER-PAR Intervention in Improving Clinical Outcomes of Type 2 Diabetes Mellitus in Primary Care: A Pragmatic Cluster Randomised Controlled Trial. *BMC Fam Pract* 17:157
46. Nilsen MS, Jersin RÅ, Ulvik A, et al (2020) 3-Hydroxyisobutyrate, A Strong Marker of Insulin Resistance in Type 2 Diabetes and Obesity That Modulates White and Brown Adipocyte Metabolism. *Diabetes* 69:1903–1916
47. Blüher M (2019) Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol* 15:288–298

48. Pacini G (2006) The hyperbolic equilibrium between insulin sensitivity and secretion. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16 Suppl 1:S22-27
49. Chiarelli F, Marcovecchio ML (2008) Insulin resistance and obesity in childhood. *Eur J Endocrinol* 159 Suppl 1:S67-74
50. Bergman RN (1989) Lilly lecture 1989. Toward physiological understanding of glucose tolerance. Minimal-model approach. *Diabetes* 38:1512–1527
51. Cornier M-A, Dabelea D, Hernandez TL, Lindstrom RC, Steig AJ, Stob NR, Van Pelt RE, Wang H, Eckel RH (2008) The metabolic syndrome. *Endocr Rev* 29:777–822
52. Poretsky L (1991) On the paradox of insulin-induced hyperandrogenism in insulin-resistant states. *Endocr Rev* 12:3–13
53. McGarry JD (2002) Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* 51:7–18
54. Brown MS, Goldstein JL (2008) Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab* 7:95–96
55. Felig P, Marliss E, Ohman JL, Cahill GF (1970) Plasma Amino Acid Levels in Diabetic Ketoacidosis. *Diabetes* 19:727–729
56. Berger M, Zimmermann-Telschow H, Berchtold P, Drost H, Müller WA, Gries FA, Zimmermann H (1978) Blood amine acid levels in patients with insulin excess (functioning insulinoma) and insulin deficiency (diabetic ketosis). *Metab Clin Exp* 27:793–799
57. Newgard CB, An J, Bain JR, et al (2009) A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance. *Cell Metab* 9:311–326
58. Wang SM, Yang RY, Wang M, Ji FS, Li HX, Tang YM, Chen WX, Dong J (2018) Identification of serum metabolites associated with obesity and traditional risk factors for metabolic disease in Chinese adults. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 28:112–118
59. McCormack SE, Shaham O, McCarthy MA, Deik AA, Wang TJ, Gerszten RE, Clish CB, Mootha VK, Grinspoon SK, Fleischman A (2013) Circulating Branched-chain Amino Acid Concentrations Are Associated with Obesity and Future Insulin Resistance in Children and Adolescents. *Pediatr Obes* 8:52–61

60. Ho JE, Larson MG, Ghorbani A, et al (2016) Metabolomic Profiles of Body Mass Index in the Framingham Heart Study Reveal Distinct Cardiometabolic Phenotypes. *PLoS One* 11:e0148361
61. Guasch-Ferré M, Hruby A, Toledo E, Clish CB, Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, Hu FB (2016) Metabolomics in Prediabetes and Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. *Diabetes Care* 39:833–846
62. Tobias DK, Hazra A, Lawler PR, Chandler PD, Chasman DI, Buring JE, Lee I-M, Cheng S, Manson JE, Mora S (2020) Circulating branched-chain amino acids and long-term risk of obesity-related cancers in women. *Sci Rep*. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73499-x>
63. Felig P, Marliss E, Cahill GF (1969) Plasma amino acid levels and insulin secretion in obesity. *N Engl J Med* 281:811–816
64. Felig P, Marliss E, Cahill GF (1970) Are plasma amino acid levels elevated in obesity? *N Engl J Med* 282:166
65. Shah SH, Crosslin DR, Haynes CS, et al (2012) Branched-chain amino acid levels are associated with improvement in insulin resistance with weight loss. *Diabetologia* 55:321–330
66. Tai ES, Tan MLS, Stevens RD, et al (2010) Insulin resistance is associated with a metabolic profile of altered protein metabolism in Chinese and Asian-Indian men. *Diabetologia* 53:757–767
67. Rousseau M, Guénard F, Garneau V, Allam-Ndoul B, Lemieux S, Pérusse L, Vohl M-C (2019) Associations Between Dietary Protein Sources, Plasma BCAA and Short-Chain Acylcarnitine Levels in Adults. *Nutrients*. <https://doi.org/10.3390/nu11010173>
68. Asghari G, Farhadnejad H, Teymoori F, Mirmiran P, Tohidi M, Azizi F (2018) High dietary intake of branched-chain amino acids is associated with an increased risk of insulin resistance in adults. *Journal of Diabetes* 10:357–364
69. Zheng Y, Li Y, Qi Q, Hruby A, Manson JE, Willett WC, Wolpin BM, Hu FB, Qi L (2016) Cumulative consumption of branched-chain amino acids and incidence of type 2 diabetes. *Int J Epidemiol* 45:1482–1492
70. Jennings A, MacGregor A, Pallister T, Spector T, Cassidy A (2016) Associations between branched chain amino acid intake and biomarkers of

adiposity and cardiometabolic health independent of genetic factors: A twin study. *Int J Cardiol* 223:992–998

71. Nagata C, Nakamura K, Wada K, Tsuji M, Tamai Y, Kawachi T (2013) Branched-chain amino acid intake and the risk of diabetes in a Japanese community: the Takayama study. *Am J Epidemiol* 178:1226–1232

72. Würtz P, Soininen P, Kangas AJ, Rönnemaa T, Lehtimäki T, Kähönen M, Viikari JS, Raitakari OT, Ala-Korpela M (2013) Branched-Chain and Aromatic Amino Acids Are Predictors of Insulin Resistance in Young Adults. *Diabetes Care* 36:648–655

73. Würtz P, Mäkinen V-P, Soininen P, et al (2012) Metabolic Signatures of Insulin Resistance in 7,098 Young Adults. *Diabetes* 61:1372–1380

74. Fiehn O, Garvey WT, Newman JW, Lok KH, Hoppel CL, Adams SH (2010) Plasma Metabolomic Profiles Reflective of Glucose Homeostasis in Non-Diabetic and Type 2 Diabetic Obese African-American Women. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015234>

75. Zhang X, van den Munckhof ICL, Rutten JHW, Netea MG, Groen AK, Zwinderman AH (2019) Association of hemoglobin A1C with circulating metabolites in Dutch with European, African Surinamese and Ghanaian background. *Nutr Diabetes*. <https://doi.org/10.1038/s41387-019-0082-0>

76. Lynch CJ, Adams SH (2014) Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol* 10:723–736

77. Wang TJ, Ngo D, Psychogios N, et al (2013) 2-Aminoadipic acid is a biomarker for diabetes risk. *J Clin Invest* 123:4309–4317

78. Lackey DE, Lynch CJ, Olson KC, et al (2013) Regulation of adipose branched-chain amino acid catabolism enzyme expression and cross-adipose amino acid flux in human obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 304:E1175-1187

79. She P, Van Horn C, Reid T, Hutson SM, Cooney RN, Lynch CJ (2007) Obesity-related elevations in plasma leucine are associated with alterations in enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E1552-1563

80. Herman MA, She P, Peroni OD, Lynch CJ, Kahn BB (2010) Adipose tissue branched chain amino acid (BCAA) metabolism modulates circulating BCAA levels. *J Biol Chem* 285:11348–11356

81. Adams SH (2011) Emerging Perspectives on Essential Amino Acid Metabolism in Obesity and the Insulin-Resistant State. *Adv Nutr* 2:445–456
82. Klimčáková E, Roussel B, Márquez-Quiñones A, et al (2011) Worsening of obesity and metabolic status yields similar molecular adaptations in human subcutaneous and visceral adipose tissue: decreased metabolism and increased immune response. *J Clin Endocrinol Metab* 96:E73-82
83. Pietiläinen KH, Naukkarinen J, Rissanen A, et al (2008) Global Transcript Profiles of Fat in Monozygotic Twins Discordant for BMI: Pathways behind Acquired Obesity. *PLoS Med*. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050051>
84. Leskinen T, Rinnankoski-Tuikka R, Rintala M, et al (2010) Differences in Muscle and Adipose Tissue Gene Expression and Cardio-Metabolic Risk Factors in the Members of Physical Activity Discordant Twin Pairs. *PLoS One* 5:e12609
85. Lan H, Rabaglia ME, Stoehr JP, Nadler ST, Schueler KL, Zou F, Yandell BS, Attie AD (2003) Gene expression profiles of nondiabetic and diabetic obese mice suggest a role of hepatic lipogenic capacity in diabetes susceptibility. *Diabetes* 52:688–700
86. Stančáková A, Civelek M, Saleem NK, et al (2012) Hyperglycemia and a Common Variant of GCKR Are Associated With the Levels of Eight Amino Acids in 9,369 Finnish Men. *Diabetes* 61:1895–1902
87. She P, Olson KC, Kadota Y, et al (2013) Leucine and Protein Metabolism in Obese Zucker Rats. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059443>
88. Harris RA, Joshi M, Jeoung NH, Obayashi M (2005) Overview of the molecular and biochemical basis of branched-chain amino acid catabolism. *J Nutr* 135:1527S–30S
89. Olson KC, Chen G, Xu Y, Hajnal A, Lynch CJ (2014) Alloisoleucine differentiates the branched-chain aminoacidemia of obese Zucker and diet-induced obesity (DIO) rats. *Obesity (Silver Spring)* 22:1212–1215
90. Kadota Y, Toyoda T, Kitaura Y, Adams SH, Yoshiharu S (2013) Regulation of hepatic branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase complex in rats fed a high-fat diet. *Obes Res Clin Pract* 7:e439–e444
91. Martin F-PJ, Montoliu I, Collino S, et al (2013) Topographical Body Fat Distribution Links to Amino Acid and Lipid Metabolism in Healthy Non-Obese Women. *PLoS One* 8:e73445

92. Laferrère B, Reilly D, Arias S, et al (2011) Differential Metabolic Impact of Gastric Bypass Surgery Versus Dietary Intervention in Obese Diabetic Subjects Despite Identical Weight Loss. *Sci Transl Med* 3:80re2
93. Newgard CB (2012) Interplay between lipids and branched-chain amino acids in development of insulin resistance. *Cell Metab* 15:606–614
94. Rocha DM, Falona GR, Unger RH (1972) Glucagon-stimulating activity of 20 amino acids in dogs. *J Clin Invest* 51:2346–2351
95. Di Cairano ES, Davalli AM, Perego L, et al (2011) The Glial Glutamate Transporter 1 (GLT1) Is Expressed by Pancreatic  $\beta$ -Cells and Prevents Glutamate-induced  $\beta$ -Cell Death. *J Biol Chem* 286:14007–14018
96. Eaton S (2002) Control of mitochondrial beta-oxidation flux. *Prog Lipid Res* 41:197–239
97. Pedersen HK, Gudmundsdottir V, Nielsen HB, et al (2016) Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature* 535:376–381
98. Jensen MD, Haymond MW (1991) Protein metabolism in obesity: effects of body fat distribution and hyperinsulinemia on leucine turnover. *Am J Clin Nutr* 53:172–176
99. Luzi L, Castellino P, DeFronzo RA (1996) Insulin and hyperaminoacidemia regulate by a different mechanism leucine turnover and oxidation in obesity. *Am J Physiol* 270:E273-281
100. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Lehrke M, Hendler RE, Shulman GI (2005) Reversal of Nonalcoholic Hepatic Steatosis, Hepatic Insulin Resistance, and Hyperglycemia by Moderate Weight Reduction in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 54:603–608
101. Shin AC, Fasshauer M, Filatova N, et al (2014) Brain insulin lowers circulating BCAA levels by inducing hepatic BCAA catabolism. *Cell Metab* 20:898–909
102. Bloomgarden Z (2018) Diabetes and branched-chain amino acids: What is the link? *J Diabetes* 10:350–352
103. Hutson SM, Cree TC, Harper AE (1978) Regulation of leucine and alpha-ketoisocaproate metabolism in skeletal muscle. *J Biol Chem* 253:8126–8133
104. Flakoll PJ, Kulaylat M, Frexes-Steed M, Hourani H, Brown LL, Hill JO, Abumrad NN (1989) Amino acids augment insulin's suppression of whole body

proteolysis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 257:E839–E847

105. Krebs M, Krssak M, Bernroider E, Anderwald C, Brehm A, Meyerspeer M, Nowotny P, Roth E, Waldhäusl W, Roden M (2002) Mechanism of amino acid-induced skeletal muscle insulin resistance in humans. *Diabetes* 51:599–605

106. Kawaguchi T, Taniguchi E, Sata M (2013) Effects of oral branched-chain amino acids on hepatic encephalopathy and outcome in patients with liver cirrhosis. *Nutr Clin Pract* 28:580–588

107. Ichikawa K, Okabayashi T, Shima Y, et al (2012) Branched-chain amino acid-enriched nutrients stimulate antioxidant DNA repair in a rat model of liver injury induced by carbon tetrachloride. *Mol Biol Rep* 39:10803–10810

108. Kuwahata M, Kubota H, Kanouchi H, Ito S, Ogawa A, Kobayashi Y, Kido Y (2012) Supplementation with branched-chain amino acids attenuates hepatic apoptosis in rats with chronic liver disease. *Nutrition Research* 32:522–529

109. Hayaishi S, Chung H, Kudo M, et al (2011) Oral branched-chain amino acid granules reduce the incidence of hepatocellular carcinoma and improve event-free survival in patients with liver cirrhosis. *Dig Dis* 29:326–332

110. Holecek M (2010) Three targets of branched-chain amino acid supplementation in the treatment of liver disease. *Nutrition* 26:482–490

111. Zhang Z, Xu G, Yang F, Zhu W, Liu X (2014) Quantitative analysis of dietary protein intake and stroke risk. *Neurology* 83:19–25

112. Qin L, Xun P, Bujnowski D, Daviglius ML, Van Horn L, Stamler J, He K (2011) Higher Branched-Chain Amino Acid Intake Is Associated with a Lower Prevalence of Being Overweight or Obese in Middle-Aged East Asian and Western Adults. *J Nutr* 141:249–254

113. Freudenberg A, Petzke KJ, Klaus S (2013) Dietary L-leucine and L-alanine supplementation have similar acute effects in the prevention of high-fat diet-induced obesity. *Amino Acids* 44:519–528

114. Macotela Y, Emanuelli B, Bang AM, Espinoza DO, Boucher J, Beebe K, Gall W, Kahn CR (2011) Dietary Leucine - An Environmental Modifier of Insulin Resistance Acting on Multiple Levels of Metabolism. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021187>

115. Doi M, Yamaoka I, Nakayama M, Sugahara K, Yoshizawa F (2007) Hypoglycemic effect of isoleucine involves increased muscle glucose uptake and whole body glucose oxidation and decreased hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:E1683-1693
116. Theytaz F, Noguchi Y, Egli L, et al (2012) Effects of supplementation with essential amino acids on intrahepatic lipid concentrations during fructose overfeeding in humans. *Am J Clin Nutr* 96:1008–1016
117. Xu L, Kanasaki M, He J, Kitada M, Nagao K, Jinzu H, Noguchi Y, Maegawa H, Kanasaki K, Koya D (2013) Ketogenic essential amino acids replacement diet ameliorated hepatosteatosis with altering autophagy-associated molecules. *Biochim Biophys Acta* 1832:1605–1612
118. Mourier A, Bigard AX, de Kerviler E, Roger B, Legrand H, Guezennec CY (1997) Combined effects of caloric restriction and branched-chain amino acid supplementation on body composition and exercise performance in elite wrestlers. *Int J Sports Med* 18:47–55
119. Solerte SB, Fioravanti M, Locatelli E, Bonacasa R, Zamboni M, Basso C, Mazzoleni A, Mansi V, Geroutis N, Gazzaruso C (2008) Improvement of blood glucose control and insulin sensitivity during a long-term (60 weeks) randomized study with amino acid dietary supplements in elderly subjects with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 101:82E-88E
120. Kawaguchi T, Nagao Y, Matsuoka H, Ide T, Sata M (2008) Branched-chain amino acid-enriched supplementation improves insulin resistance in patients with chronic liver disease. *Int J Mol Med* 22:105–112
121. Marchesini G, Bianchi G, Merli M, Amodio P, Panella C, Loguercio C, Rossi Fanelli F, Abbiati R, Italian BCAA Study Group (2003) Nutritional supplementation with branched-chain amino acids in advanced cirrhosis: a double-blind, randomized trial. *Gastroenterology* 124:1792–1801
122. Nakaya Y, Okita K, Suzuki K, et al (2007) BCAA-enriched snack improves nutritional state of cirrhosis. *Nutrition* 23:113–120
123. Nairizi A, She P, Vary TC, Lynch CJ (2009) Leucine Supplementation of Drinking Water Does Not Alter Susceptibility to Diet-Induced Obesity in Mice. *J Nutr* 139:715–719

124. Zhang Y, Guo K, LeBlanc RE, Loh D, Schwartz GJ, Yu Y-H (2007) Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multimechanisms. *Diabetes* 56:1647–1654
125. Layman DK, Clifton P, Gannon MC, Krauss RM, Nuttall FQ (2008) Protein in optimal health: heart disease and type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 87:1571S-1575S
126. Devkota S, Layman DK (2010) Protein metabolic roles in treatment of obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13:403–407
127. Mahendran Y, Jonsson A, Have CT, Allin KH, Witte DR, Jørgensen ME, Grarup N, Pedersen O, Kilpeläinen TO, Hansen T (2017) Genetic evidence of a causal effect of insulin resistance on branched-chain amino acid levels. *Diabetologia* 60:873–878
128. Esch N, Jo S, Moore M, Alejandro EU (2020) Nutrient Sensor mTOR and OGT: Orchestrators of Organelle Homeostasis in Pancreatic  $\beta$ -Cells. *J Diabetes Res*. <https://doi.org/10.1155/2020/8872639>
129. Yang J, Chi Y, Burkhardt BR, Guan Y, Wolf BA (2010) Leucine metabolism in regulation of insulin secretion from pancreatic beta cells. *Nutr Rev* 68:270–279
130. McDaniel ML, Marshall CA, Pappan KL, Kwon G (2002) Metabolic and autocrine regulation of the mammalian target of rapamycin by pancreatic beta-cells. *Diabetes* 51:2877–2885
131. Leibowitz G, Cerasi E, Ketzinel-Gilad M (2008) The role of mTOR in the adaptation and failure of beta-cells in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 10 Suppl 4:157–169
132. Le Bacquer O, Queniat G, Gmyr V, Kerr-Conte J, Lefebvre B, Pattou F (2013) mTORC1 and mTORC2 regulate insulin secretion through Akt in INS-1 cells. *J Endocrinol* 216:21–29
133. Bartolome A, Guillén C (2014) Role of the mammalian target of rapamycin (mTOR) complexes in pancreatic  $\beta$ -cell mass regulation. *Vitam Horm* 95:425–469
134. Chakrabarti P, English T, Shi J, Smas CM, Kandror KV (2010) Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 Suppresses Lipolysis, Stimulates Lipogenesis, and Promotes Fat Storage. *Diabetes* 59:775–781
135. Ricoult SJH, Manning BD (2013) The multifaceted role of mTORC1 in the control of lipid metabolism. *EMBO Rep* 14:242–251

136. Bar Yamin H, Barnea M, Genzer Y, Chapnik N, Froy O (2014) Long-term commercial cow's milk consumption and its effects on metabolic parameters associated with obesity in young mice. *Mol Nutr Food Res* 58:1061–1068
137. Howell JJ, Ricoult SJH, Ben-Sahra I, Manning BD (2013) A growing role for mTOR in promoting anabolic metabolism. *Biochem Soc Trans* 41:906–912
138. Yoon M-S, Zhang C, Sun Y, Schoenherr CJ, Chen J (2013) Mechanistic target of rapamycin controls homeostasis of adipogenesis. *J Lipid Res* 54:2166–2173
139. Xu J, Ji J, Yan X-H (2012) Cross-talk between AMPK and mTOR in regulating energy balance. *Crit Rev Food Sci Nutr* 52:373–381
140. Alejandro EU, Gregg B, Blandino-Rosano M, Cras-Méneur C, Bernal-Mizrachi E (2015) Natural history of  $\beta$ -cell adaptation and failure in type 2 diabetes. *Mol Aspects Med* 42:19–41
141. Prentki M, Peyot M-L, Masiello P, Madiraju SRM (2020) Nutrient-Induced Metabolic Stress, Adaptation, Detoxification, and Toxicity in the Pancreatic  $\beta$ -Cell. *Diabetes* 69:279–290
142. Elghazi L, Blandino-Rosano M, Alejandro E, Cras-Méneur C, Bernal-Mizrachi E (2017) Role of nutrients and mTOR signaling in the regulation of pancreatic progenitors development. *Mol Metab* 6:560–573
143. Chotechuan N, Azzout-Marniche D, Bos C, Chaumontet C, Gausserès N, Steiler T, Gaudichon C, Tomé D (2009) mTOR, AMPK, and GCN2 coordinate the adaptation of hepatic energy metabolic pathways in response to protein intake in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297:E1313-1323
144. Lu J, Xie G, Jia W, Jia W (2013) Insulin resistance and the metabolism of branched-chain amino acids. *Front Med* 7:53–59
145. Thedieck K, Holzwarth B, Prentzell MT, et al (2013) Inhibition of mTORC1 by astrin and stress granules prevents apoptosis in cancer cells. *Cell* 154:859–874
146. Melnik BC, John SM, Carrera-Bastos P, Cordain L (2012) The impact of cow's milk-mediated mTORC1-signaling in the initiation and progression of prostate cancer. *Nutr Metab (Lond)* 9:74
147. Chang L, Chiang S-H, Saltiel AR (2004) Insulin Signaling and the Regulation of Glucose Transport. *Mol Med* 10:65–71

148. Melnik BC (2012) Leucine signaling in the pathogenesis of type 2 diabetes and obesity. *World J Diabetes* 3:38–53
149. Yoon M-S (2016) The Emerging Role of Branched-Chain Amino Acids in Insulin Resistance and Metabolism. *Nutrients*. <https://doi.org/10.3390/nu8070405>
150. White MF (1998) The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem* 182:3–11
151. Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM (2005) Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol* 17:596–603
152. Alessi DR, Kozlowski MT, Weng QP, Morrice N, Avruch J (1998) 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro. *Curr Biol* 8:69–81
153. Harrington LS, Findlay GM, Gray A, et al (2004) The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin–PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J Cell Biol* 166:213–223
154. Ozes ON, Akca H, Mayo LD, Gustin JA, Maehama T, Dixon JE, Donner DB (2001) A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4640–4645
155. Tremblay F, Brûlé S, Hee Um S, et al (2007) Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14056–14061
156. Carlson CJ, White MF, Rondinone CM (2004) Mammalian target of rapamycin regulates IRS-1 serine 307 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 316:533–539
157. Du M, Shen QW, Zhu MJ, Ford SP (2007) Leucine stimulates mammalian target of rapamycin signaling in C2C12 myoblasts in part through inhibition of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *J Anim Sci* 85:919–927
158. Gleason CE, Lu D, Witters LA, Newgard CB, Birnbaum MJ (2007) The role of AMPK and mTOR in nutrient sensing in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 282:10341–10351
159. Salt IP, Johnson G, Ashcroft SJ, Hardie DG (1998) AMP-activated protein kinase is activated by low glucose in cell lines derived from pancreatic beta cells, and may regulate insulin release. *Biochem J* 335:533–539

160. Raile K, Klammt J, Laue S, Garten A, Blüher M, Kralisch S, Klötting N, Kiess W (2005) Glucose concentration and AMP-dependent kinase activation regulate expression of insulin receptor family members in rat islets and INS-1E beta cells. *Diabetologia* 48:1798–1809
161. Wang X, Zhou L, Li G, Luo T, Gu Y, Qian L, Fu X, Li F, Li J, Luo M (2007) Palmitate activates AMP-activated protein kinase and regulates insulin secretion from beta cells. *Biochem Biophys Res Commun* 352:463–468
162. Ravnskjaer K, Boergesen M, Dalgaard LT, Mandrup S (2006) Glucose-induced repression of PPARalpha gene expression in pancreatic beta-cells involves PP2A activation and AMPK inactivation. *J Mol Endocrinol* 36:289–299
163. Del Guerra S, Lupi R, Marselli L, et al (2005) Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes* 54:727–735
164. Solimena M, Schulte AM, Marselli L, et al (2018) Systems biology of the IMIDIA biobank from organ donors and pancreatectomised patients defines a novel transcriptomic signature of islets from individuals with type 2 diabetes. *Diabetologia* 61:641–657
165. Gu Y, Lindner J, Kumar A, Yuan W, Magnuson MA (2011) Rictor/mTORC2 Is Essential for Maintaining a Balance Between  $\beta$ -Cell Proliferation and Cell Size. *Diabetes* 60:827–837
166. Yuan T, Lupse B, Maedler K, Ardestani A (2018) mTORC2 Signaling: A Path for Pancreatic  $\beta$  Cell's Growth and Function. *Journal of Molecular Biology* 430:904–918
167. Soliman GA, Schooling CM (2020) Causal association between mTOR-dependent EIF-4E and EIF-4A circulating protein levels and type 2 diabetes: a Mendelian randomization study. *Sci Rep.* <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71987-8>
168. Ardestani A, Maedler K (2016) MST1: a promising therapeutic target to restore functional beta cell mass in diabetes. *Diabetologia* 59:1843–1849
169. Ardestani A, Paroni F, Azizi Z, et al (2014) MST1 is a key regulator of beta cell apoptosis and dysfunction in diabetes. *Nat Med* 20:385–397
170. Blandino-Rosano M, Chen AY, Scheys JO, Alejandro EU, Gould AP, Taranukha T, Elghazi L, Cras-Méneur C, Bernal-Mizrachi E (2012) mTORC1 signaling and regulation of pancreatic  $\beta$ -cell mass. *Cell Cycle* 11:1892–1902

171. Xie Y, Cui C, Nie A, et al (2017) The mTORC2/PKC pathway sustains compensatory insulin secretion of pancreatic  $\beta$  cells in response to metabolic stress. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1861:2039–2047
172. Yuan T, Rafizadeh S, Gorrepati KDD, Lupsch B, Oberholzer J, Maedler K, Ardestani A (2017) Reciprocal regulation of mTOR complexes in pancreatic islets from humans with type 2 diabetes. *Diabetologia* 60:668–678
173. Wang L, Liu Y, Yan Lu S, Nguyen K-TT, Schroer SA, Suzuki A, Mak TW, Gaisano H, Woo M (2010) Deletion of Pten in Pancreatic  $\beta$ -Cells Protects Against Deficient  $\beta$ -Cell Mass and Function in Mouse Models of Type 2 Diabetes. *Diabetes* 59:3117–3126
174. Barbour LA, McCurdy CE, Hernandez TL, Friedman JE (2011) Chronically increased S6K1 is associated with impaired IRS1 signaling in skeletal muscle of GDM women with impaired glucose tolerance postpartum. *J Clin Endocrinol Metab* 96:1431–1441
175. Khamzina L, Veilleux A, Bergeron S, Marette A (2005) Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology* 146:1473–1481
176. Tremblay F, Krebs M, Dombrowski L, Brehm A, Bernroider E, Roth E, Nowotny P, Waldhäusl W, Marette A, Roden M (2005) Overactivation of S6 kinase 1 as a cause of human insulin resistance during increased amino acid availability. *Diabetes* 54:2674–2684
177. Floegel A, Stefan N, Yu Z, et al (2013) Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach. *Diabetes* 62:639–648
178. Wang-Sattler R, Yu Z, Herder C, et al (2012) Novel biomarkers for pre-diabetes identified by metabolomics. *Mol Syst Biol* 8:615
179. Yamakado M, Nagao K, Imaizumi A, et al (2015) Plasma Free Amino Acid Profiles Predict Four-Year Risk of Developing Diabetes, Metabolic Syndrome, Dyslipidemia, and Hypertension in Japanese Population. *Sci Rep*. <https://doi.org/10.1038/srep11918>

180. Würtz P, Tiainen M, Mäkinen V-P, et al (2012) Circulating Metabolite Predictors of Glycemia in Middle-Aged Men and Women. *Diabetes Care* 35:1749–1756
181. Shaham O, Wei R, Wang TJ, Ricciardi C, Lewis GD, Vasan RS, Carr SA, Thadhani R, Gerszten RE, Mootha VK (2008) Metabolic profiling of the human response to a glucose challenge reveals distinct axes of insulin sensitivity. *Mol Syst Biol* 4:214
182. Rebholz CM, Yu B, Zheng Z, Chang P, Tin A, Köttgen A, Wagenknecht LE, Coresh J, Boerwinkle E, Selvin E (2018) Serum metabolomic profile of incident diabetes. *Diabetologia* 61:1046–1054
183. Yu D, Moore SC, Matthews CE, Xiang Y-B, Zhang X, Gao Y-T, Zheng W, Shu X-O (2016) Plasma metabolomic profiles in association with type 2 diabetes risk and prevalence in Chinese adults. *Metabolomics*. <https://doi.org/10.1007/s11306-015-0890-8>
184. Palmer ND, Stevens RD, Antinozzi PA, Anderson A, Bergman RN, Wagenknecht LE, Newgard CB, Bowden DW (2015) Metabolomic Profile Associated With Insulin Resistance and Conversion to Diabetes in the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *J Clin Endocrinol Metab* 100:E463–E468
185. de Almeida-Pititto B, Dualib PM, Jordão MC, et al (2021) Branched-chain amino acids predict incident diabetes in the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health – ELSA-Brasil. *Diabetes Research and Clinical Practice* 174:108747
186. Rasheed IA, Alwasiti EAR, Al-Karawi IN (2021) Role of Branched Chain Amino Acid and Glycine in Prediabetes and Type II Diabetes Mellitus. *ATMPH*. <https://doi.org/10.36295/ASRO.2021.24223>
187. Flores-Guerrero JL, Osté MCJ, Kieneker LM, Gruppen EG, Wolak-Dinsmore J, Otvos JD, Connelly MA, Bakker SJL, Dullaart RPF (2018) Plasma Branched-Chain Amino Acids and Risk of Incident Type 2 Diabetes: Results from the PREVEND Prospective Cohort Study. *J Clin Med*. <https://doi.org/10.3390/jcm7120513>
188. Chen T, Ni Y, Ma X, et al (2016) Branched-chain and aromatic amino acid profiles and diabetes risk in Chinese populations. *Sci Rep*. <https://doi.org/10.1038/srep20594>

189. Lee CC, Watkins SM, Lorenzo C, Wagenknecht LE, Il'yasova D, Chen Y-DI, Haffner SM, Hanley AJ (2016) Branched-Chain Amino Acids and Insulin Metabolism: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Diabetes Care* 39:582–588
190. Liu J, Semiz S, van der Lee SJ, et al (2017) Metabolomics based markers predict type 2 diabetes in a 14-year follow-up study. *Metabolomics* 13:104
191. Menni C, Fauman E, Erte I, et al (2013) Biomarkers for Type 2 Diabetes and Impaired Fasting Glucose Using a Nontargeted Metabolomics Approach. *Diabetes* 62:4270–4276
192. Reina-Campos M, Moscat J, Diaz-Meco M (2017) Metabolism Shapes the Tumor Microenvironment. *Curr Opin Cell Biol* 48:47–53
193. DeBerardinis RJ, Chandel NS (2016) Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv* 2:e1600200
194. Vazquez A, Kamphorst JJ, Markert EK, Schug ZT, Tardito S, Gottlieb E (2016) Cancer metabolism at a glance. *J Cell Sci* 129:3367–3373
195. Lyssiotis CA, Kimmelman AC (2017) Metabolic Interactions in the Tumor Microenvironment. *Trends Cell Biol* 27:863–875
196. Ananieva E (2015) Targeting amino acid metabolism in cancer growth and anti-tumor immune response. *World J Biol Chem* 6:281–289
197. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68:394–424
198. Muniraj T, Jamidar PA, Aslanian HR (2013) Pancreatic cancer: a comprehensive review and update. *Dis Mon* 59:368–402
199. Ilic M, Ilic I (2016) Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 22:9694–9705
200. Heinemann V (2001) Gemcitabine: progress in the treatment of pancreatic cancer. *Oncology* 60:8–18
201. Mario C, Marilisa F, Kryssia IR-C, et al (2018) Epidemiology and risk factors of pancreatic cancer. *Acta Biomed* 89:141–146

202. Bax C, Lotesoriere BJ, Sironi S, Capelli L (2019) Review and Comparison of Cancer Biomarker Trends in Urine as a Basis for New Diagnostic Pathways. *Cancers (Basel)*. <https://doi.org/10.3390/cancers11091244>
203. Walsh N, Zhang H, Hyland PL, et al (2018) Agnostic Pathway/Gene Set Analysis of Genome-Wide Association Data Identifies Associations for Pancreatic Cancer. *J Natl Cancer Inst* 111:557–567
204. Murphy KJ, Chambers CR, Herrmann D, Timpson P, Pereira BA (2021) Dynamic Stromal Alterations Influence Tumor-Stroma Crosstalk to Promote Pancreatic Cancer and Treatment Resistance. *Cancers (Basel)* 13:3481
205. Itoi T, Sugimoto M, Umeda J, et al (2017) Serum Metabolomic Profiles for Human Pancreatic Cancer Discrimination. *Int J Mol Sci* 18:767
206. Xie G, Lu L, Qiu Y, Ni Q, Zhang W, Gao Y-T, Risch HA, Yu H, Jia W (2015) Plasma Metabolite Biomarkers for the Detection of Pancreatic Cancer. *J Proteome Res* 14:1195–1202
207. Aier I, Semwal R, Sharma A, Varadwaj PK (2019) A systematic assessment of statistics, risk factors, and underlying features involved in pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol* 58:104–110
208. Holmstrom SR, Olive KP (2014) Protein breakdown precedes pancreatic tumor development. *Nat Med* 20:1097–1099
209. Pang Y, Holmes MV, Chen Z, Kartsonaki C (2019) A review of lifestyle, metabolic risk factors, and blood-based biomarkers for early diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 34:330–345
210. Yip-Schneider MT, Simpson R, Carr RA, Wu H, Fan H, Liu Z, Korc M, Zhang J, Max Schmidt C (2019) Circulating Leptin and Branched Chain Amino Acids – Correlation with Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm Dysplastic Grade. *J Gastrointest Surg* 23:966–974
211. Matthaei H, Schulick RD, Hruban RH, Maitra A (2011) Cystic precursors to invasive pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8:141–150
212. Basturk O, Hong S-M, Wood LD, et al (2015) A REVISED CLASSIFICATION SYSTEM AND RECOMMENDATIONS FROM THE BALTIMORE CONSENSUS MEETING FOR NEOPLASTIC PRECURSOR LESIONS IN THE PANCREAS. *Am J Surg Pathol* 39:1730–1741

213. Patra KC, Bardeesy N, Mizukami Y (2017) Diversity of Precursor Lesions For Pancreatic Cancer: The Genetics and Biology of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm. *Clin Transl Gastroenterol* 8:e86
214. Lowenfels AB, Maisonneuve P (2005) Risk factors for pancreatic cancer. *J Cell Biochem* 95:649–656
215. Golob-Schwarzl N, Puchas P, Gogg-Kamerer M, Weichert W, Göppert B, Haybaeck J (2020) New Pancreatic Cancer Biomarkers eIF1, eIF2D, eIF3C and eIF6 Play a Major Role in Translational Control in Ductal Adenocarcinoma. *Anticancer Research* 40:3109–3118
216. Cox AD, Der CJ (2010) Ras history. *Small GTPases* 1:2–27
217. Simanshu DK, Nissley DV, McCormick F (2017) RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell* 170:17–33
218. Zeitouni D, Pylayeva-Gupta Y, Der CJ, Bryant KL (2016) KRAS Mutant Pancreatic Cancer: No Lone Path to an Effective Treatment. *Cancers (Basel)*. <https://doi.org/10.3390/cancers8040045>
219. Jones S, Zhang X, Parsons DW, et al (2008) Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses. *Science* 321:1801–1806
220. Costello E, Greenhalf W, Neoptolemos JP (2012) New biomarkers and targets in pancreatic cancer and their application to treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9:435–444
221. Tape CJ, Ling S, Dimitriadi M, et al (2016) Oncogenic KRAS Regulates Tumor Cell Signaling via Stromal Reciprocation. *Cell* 165:1818
222. Mayers JR, Wu C, Clish CB, et al (2014) Elevation of circulating branched-chain amino acids is an early event in human pancreatic adenocarcinoma development. *Nat Med* 20:1193–1198
223. Comisso C, Davidson SM, Soydaner-Azeloglu RG, et al (2013) Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature* 497:633–637
224. Li J-T, Yin M, Wang D, et al (2020) BCAT2-mediated BCAA catabolism is critical for development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Cell Biol* 22:167–174

225. Ananieva EA, Wilkinson AC (2018) Branched-chain amino acid metabolism in cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 21:64–70
226. Lee JH, Cho Y-R, Kim JH, Kim J, Nam HY, Kim SW, Son J (2019) Branched-chain amino acids sustain pancreatic cancer growth by regulating lipid metabolism. *Exp Mol Med* 51:146
227. Mayers JR, Torrence ME, Danai LV, et al (2016) Tissue-of-origin Dictates Branched-Chain Amino Acid Metabolism in Mutant Kras-driven Cancers. *Science* 353:1161–1165
228. Hattori A, Tsunoda M, Konuma T, et al (2017) Cancer progression by reprogrammed BCAA metabolism in myeloid leukaemia. *Nature* 545:500–504
229. Tönjes M, Barbus S, Park YJ, et al (2013) BCAT1 promotes cell proliferation through amino acid catabolism in gliomas carrying wild-type IDH1. *Nat Med* 19:901–908
230. Dey P, Baddour J, Muller F, et al (2017) Genomic deletion of malic enzyme 2 confers collateral lethality in pancreatic cancer. *Nature* 542:119–123
231. Sweatt AJ, Wood M, Suryawan A, Wallin R, Willingham MC, Hutson SM (2004) Branched-chain amino acid catabolism: unique segregation of pathway enzymes in organ systems and peripheral nerves. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 286:E64–E76
232. Lei M-Z, Li X-X, Zhang Y, Li J-T, Zhang F, Wang Y-P, Yin M, Qu J, Lei Q-Y (2020) Acetylation promotes BCAT2 degradation to suppress BCAA catabolism and pancreatic cancer growth. *Signal Transduct Target Ther.* <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0168-0>
233. Muhammad N, Lee HM, Kim J (2020) Oncology Therapeutics Targeting the Metabolism of Amino Acids. *Cells.* <https://doi.org/10.3390/cells9081904>
234. Hayashi K, Jutabha P, Endou H, Anzai N (2012) c-Myc is crucial for the expression of LAT1 in MIA Paca-2 human pancreatic cancer cells. *Oncology Reports* 28:862–866
235. Tajiri K, Shimizu Y (2018) Branched-chain amino acids in liver diseases. *Transl Gastroenterol Hepatol* 3:47
236. Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW (2006) Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 6:184–192

237. Benavent M, de Miguel MJ, Garcia-Carbonero R (2012) New targeted agents in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Targ Oncol* 7:99–106
238. Cohen Y, Merhavi-Shoham E, Avraham-Lubin BCR, Savetsky M, Frenkel S, Pe'er J, Goldenberg-Cohen N (2009) PI3K/Akt pathway mutations in retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:5054–5056
239. Höckel M, Vaupel P (2001) Biological consequences of tumor hypoxia. *Seminars in Oncology* 28:36–41
240. Driscoll DR, Karim SA, Sano M, et al (2016) mTORC2 signaling drives the development and progression of pancreatic cancer. *Cancer Res* 76:6911–6923
241. Matsubara S, Ding Q, Miyazaki Y, Kuwahata T, Tsukasa K, Takao S (2013) mTOR plays critical roles in pancreatic cancer stem cells through specific and stemness-related functions. *Sci Rep*. <https://doi.org/10.1038/srep03230>
242. Morran DC, Wu J, Jamieson NB, et al (2014) Targeting mTOR dependency in pancreatic cancer. *Gut* 63:1481–1489
243. Fan H (2020) Critical role of mTOR in regulating aerobic glycolysis in carcinogenesis (Review). *International Journal of Oncology* 58:9–19
244. Conciatori F (2018) mTOR Cross-Talk in Cancer and Potential for Combination Therapy. *Cancers* 10:23
245. Bellizzi AM, Bloomston M, Zhou X-P, Iwenofu OH, Frankel WL (2010) The mTOR Pathway is Frequently Activated in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Chronic Pancreatitis. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 18:442–447
246. Guo Y, Zhu H, Weng M, Zhang H, Wang C, Sun L (2020) CC-223, NSC781406, and BGT226 Exerts a Cytotoxic Effect Against Pancreatic Cancer Cells via mTOR Signaling. *Front Pharmacol*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.580407>
247. Kumari S, Khan S, Sekhri R, Mandil H, Behrman S, Yallapu MM, Chauhan SC, Jaggi M (2020) Protein kinase D1 regulates metabolic switch in pancreatic cancer via modulation of mTORC1. *Br J Cancer* 122:121–131
248. Mao Z, Zhang W (2018) Role of mTOR in Glucose and Lipid Metabolism. *Int J Mol Sci* 19:2043

249. Eser S, Reiff N, Messer M, et al (2013) Selective requirement of PI3K/PDK1 signaling for Kras oncogene-driven pancreatic cell plasticity and cancer. *Cancer Cell* 23:406–420
250. Kwon J, Stephan S, Mukhopadhyay A, Muders MH, Dutta SK, Lau JS, Mukhopadhyay D (2009) Insulin Receptor Substrate-2 Mediated Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor Overexpression in Pancreatic Adenocarcinoma Through PKC  $\delta$ . *Cancer Res* 69:1350–1357
251. Javle MM, Shroff RT, Xiong H, Varadhachary GA, Fogelman D, Reddy SA, Davis D, Zhang Y, Wolff RA, Abbruzzese JL (2010) Inhibition of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in advanced pancreatic cancer: results of two phase II studies. *BMC Cancer* 10:368
252. Eibl G, Rozengurt E (2019) KRAS, YAP, and obesity in pancreatic cancer: a signaling network with multiple loops. *Semin Cancer Biol* 54:50–62
253. Fuchs BC, Bode BP (2005) Amino acid transporters ASCT2 and LAT1 in cancer: partners in crime? *Semin Cancer Biol* 15:254–266
254. Kaira K, Sunose Y, Arakawa K, et al (2012) Prognostic significance of L-type amino-acid transporter 1 expression in surgically resected pancreatic cancer. *Br J Cancer* 107:632–638
255. Feng M, Xiong G, Cao Z, Yang G, Zheng S, Qiu J, You L, Zheng L, Zhang T, Zhao Y (2018) LAT2 regulates glutamine-dependent mTOR activation to promote glycolysis and chemoresistance in pancreatic cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0947-4>
256. Shu X, Zheng W, Yu D, et al (2018) Prospective metabolomics study identifies potential novel blood metabolites associated with pancreatic cancer risk. *Int J Cancer* 143:2161–2167
257. Katagiri R, Goto A, Nakagawa T, et al (2018) Increased Levels of Branched-Chain Amino Acid Associated With Increased Risk of Pancreatic Cancer in a Prospective Case-Control Study of a Large Cohort. *Gastroenterology* 155:1474-1482.e1
258. Wen S, Li Z, Feng J, Bai J, Lin X, Huang H (2016) Metabonomic changes from pancreatic intraepithelial neoplasia to pancreatic ductal adenocarcinoma in tissues from rats. *Cancer Sci* 107:836–845

259. Kawaguchi T, Yamagishi S, Sata M (2009) Branched-chain amino acids and pigment epithelium-derived factor: novel therapeutic agents for hepatitis c virus-associated insulin resistance. *Curr Med Chem* 16:4843–4857
260. Kawaguchi T, Izumi N, Charlton MR, Sata M (2011) Branched-chain amino acids as pharmacological nutrients in chronic liver disease. *Hepatology* 54:1063–1070
261. Tabaru A, Shirohara H, Moriyama A, Otsuki M (1998) Effects of branched-chain-enriched amino acid solution on insulin and glucagon secretion and blood glucose level in liver cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 33:853–859
262. Korenaga K, Korenaga M, Uchida K, Yamasaki T, Sakaida I (2008) Effects of a late evening snack combined with alpha-glucosidase inhibitor on liver cirrhosis. *Hepatol Res* 38:1087–1097
263. Sakaida I, Tsuchiya M, Okamoto M, Okita K (2004) Late evening snack and the change of blood glucose level in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res* 30S:67–72
264. Kawaguchi T, Taniguchi E, Itou M, Sumie S, Oriishi T, Matsuoka H, Nagao Y, Sata M (2007) Branched-chain amino acids improve insulin resistance in patients with hepatitis C virus-related liver disease: report of two cases. *Liver Int* 27:1287–1292
265. Dugan CE, Fernandez ML (2014) Effects of Dairy on Metabolic Syndrome Parameters: A Review. *Yale J Biol Med* 87:135–147
266. Layman DK, Shiue H, Sather C, Erickson DJ, Baum J (2003) Increased dietary protein modifies glucose and insulin homeostasis in adult women during weight loss. *J Nutr* 133:405–410
267. Cota D, Proulx K, Smith KAB, Kozma SC, Thomas G, Woods SC, Seeley RJ (2006) Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* 312:927–930
268. She P, Reid TM, Bronson SK, Vary TC, Hajnal A, Lynch CJ, Hutson SM (2007) Disruption of BCATm in mice leads to increased energy expenditure associated with the activation of a futile protein turnover cycle. *Cell Metab* 6:181–194
269. Xiao F, Huang Z, Li H, et al (2011) Leucine Deprivation Increases Hepatic Insulin Sensitivity via GCN2/mTOR/S6K1 and AMPK Pathways. *Diabetes* 60:746–756

270. White PJ, McGarrah RW, Grimsrud PA, et al (2018) The BCKDH kinase and phosphatase integrate BCAA and lipid metabolism via regulation of ATP-citrate lyase. *Cell Metab* 27:1281-1293.e7
271. White PJ, Lapworth AL, An J, et al (2016) Branched-chain amino acid restriction in Zucker-fatty rats improves muscle insulin sensitivity by enhancing efficiency of fatty acid oxidation and acyl-glycine export. *Mol Metab* 5:538–551
272. Fontana L, Cummings NE, Arriola Apelo SI, et al (2016) Decreased Consumption of Branched-Chain Amino Acids Improves Metabolic Health. *Cell Rep* 16:520–530
273. Weickert MO, Roden M, Isken F, et al (2011) Effects of supplemented isoenergetic diets differing in cereal fiber and protein content on insulin sensitivity in overweight humans. *Am J Clin Nutr* 94:459–471
274. Magkos F, Bradley D, Schweitzer GG, Finck BN, Eagon JC, Ilkayeva O, Newgard CB, Klein S (2013) Effect of Roux-en-Y Gastric Bypass and Laparoscopic Adjustable Gastric Banding on Branched-Chain Amino Acid Metabolism. *Diabetes* 62:2757–2761
275. D'Antona G, Ragni M, Cardile A, et al (2010) Branched-chain amino acid supplementation promotes survival and supports cardiac and skeletal muscle mitochondrial biogenesis in middle-aged mice. *Cell Metab* 12:362–372
276. Merino J, Leong A, Liu C-T, et al (2018) Metabolomics insights into early type 2 diabetes pathogenesis and detection in individuals with normal fasting glucose. *Diabetologia* 61:1315–1324
277. Wang Q, Holmes MV, Davey Smith G, Ala-Korpela M (2017) Genetic Support for a Causal Role of Insulin Resistance on Circulating Branched-Chain Amino Acids and Inflammation. *Diabetes Care* 40:1779–1786
278. Taneera J, Lang S, Sharma A, et al (2012) A Systems Genetics Approach Identifies Genes and Pathways for Type 2 Diabetes in Human Islets. *Cell Metabolism* 16:122–134
279. Tiffin N, Adie E, Turner F, et al (2006) Computational disease gene identification: a concert of methods prioritizes type 2 diabetes and obesity candidate genes. *Nucleic Acids Res* 34:3067–3081

280. Shimomura Y, Murakami T, Nakai N, Nagasaki M, Harris RA (2004) Exercise promotes BCAA catabolism: effects of BCAA supplementation on skeletal muscle during exercise. *J Nutr* 134:1583S-1587S
281. Suhre K, Meisinger C, Döring A, et al (2010) Metabolic Footprint of Diabetes: A Multiplatform Metabolomics Study in an Epidemiological Setting. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013953>
282. Mattick JSA, Kamisoglu K, Ierapetritou MG, Androulakis IP, Berthiaume F (2013) Branched Chain Amino Acid Supplementation: Impact on Signaling and Relevance to Critical Illness. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 5:449–460
283. Huffman KM, Shah SH, Stevens RD, et al (2009) Relationships Between Circulating Metabolic Intermediates and Insulin Action in Overweight to Obese, Inactive Men and Women. *Diabetes Care* 32:1678–1683
284. Ericksen RE, Lim SL, McDonnell E, et al (2019) Loss of BCAA Catabolism during Carcinogenesis Enhances mTORC1 Activity and Promotes Tumor Development and Progression. *Cell Metab* 29:1151-1165.e6
285. Raffel S, Falcone M, Kneisel N, et al (2017) BCAT1 restricts  $\alpha$ KG levels in AML stem cells leading to IDHmut-like DNA hypermethylation. *Nature* 551:384–388
286. Neinast MD, Jang C, Hui S, et al (2019) Quantitative Analysis of the Whole-Body Metabolic Fate of Branched-Chain Amino Acids. *Cell Metab* 29:417-429.e4
287. Tabernero J, Rojo F, Calvo E, et al (2008) Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 26:1603–1610
288. Rodrik-Outmezguine VS, Okaniwa M, Yao Z, et al (2016) Overcoming mTOR Resistance Mutations with a New Generation mTOR Inhibitor. *Nature* 534:272–276
289. Palm W, Park Y, Wright K, Pavlova NN, Tuveson DA, Thompson CB (2015) The Utilization of Extracellular Proteins as Nutrients Is Suppressed by mTORC1. *Cell* 162:259–270
290. Saiyin H, Na N, Han X, Fang Y, Wu Y, Lou W, Yang X (2017) BRSK2 induced by nutrient deprivation promotes Akt activity in pancreatic cancer via downregulation of mTOR activity. *Oncotarget* 8:44669–44681

291. Allen-Petersen BL, Risom T, Feng Z, et al (2019) Activation of PP2A and inhibition of mTOR synergistically reduce MYC signaling and decrease tumor growth in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res* 79:209–219
292. Rodon J, Dienstmann R, Serra V, Tabernero J (2013) Development of PI3K inhibitors: lessons learned from early clinical trials. *Nat Rev Clin Oncol* 10:143–153
293. Hassan Z, Schneeweis C, Wirth M, et al (2018) MTOR inhibitor-based combination therapies for pancreatic cancer. *Br J Cancer* 118:366–377
294. Vancura A, Bu P, Bhagwat M, Zeng J, Vancurova I (2018) Metformin as an Anticancer Agent. *Trends Pharmacol Sci* 39:867–878
295. Kong B, Wu W, Cheng T, et al (2016) A subset of metastatic pancreatic ductal adenocarcinomas depends quantitatively on oncogenic Kras/Mek/Erk-induced hyperactive mTOR signalling. *Gut* 65:647–657
296. Engelman JA, Chen L, Tan X, et al (2008) Effective Use of PI3K and MEK Inhibitors to Treat Mutant K-Ras G12D and PIK3CA H1047R Murine Lung Cancers. *Nat Med* 14:1351–1356
297. O’Connell TM (2013) The complex role of branched chain amino acids in diabetes and cancer. *Metabolites* 3:931–945
298. Fukutake N, Ueno M, Hiraoka N, et al (2015) A Novel Multivariate Index for Pancreatic Cancer Detection Based On the Plasma Free Amino Acid Profile. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132223>
299. Fang F, He X, Deng H, Chen Q, Lu J, Spraul M, Yu Y (2007) Discrimination of metabolic profiles of pancreatic cancer from chronic pancreatitis by high-resolution magic angle spinning <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance and principal components analysis. *Cancer Science* 98:1678–1682
300. He X-H, Li W-T, Gu Y-J, Yang B-F, Deng H-W, Yu Y-H, Peng W-J (2013) Metabonomic studies of pancreatic cancer response to radiotherapy in a mouse xenograft model using magnetic resonance spectroscopy and principal components analysis. *World J Gastroenterol* 19:4200–4208
301. Jiao L, Maity S, Coarfa C, et al (2019) A prospective targeted serum metabolomics study of pancreatic cancer in postmenopausal women. *Cancer Prev Res (Phila)* 12:237–246

302. He X, Zhong J, Wang S, Zhou Y, Wang L, Zhang Y, Yuan Y (2017) Serum metabolomics differentiating pancreatic cancer from new-onset diabetes. *Oncotarget* 8:29116–29124
303. Fest J, Vijfhuizen LS, Goeman JJ, et al (2019) Search for Early Pancreatic Cancer Blood Biomarkers in Five European Prospective Population Biobanks Using Metabolomics. *Endocrinology* 160:1731–1742