

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Lucie Šafrhansová

Změny v metabolismu aminokyselin u nádorových buněk a jejich využití v cílené terapii
Targeted cancer therapy based on altered metabolism of amino acids

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Júlia Starková, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 4. května 2021

.....

Lucie Šafrhansová

Poděkování

V první řadě velmi děkuji mé školitelce RNDr. Júlíi Starkové, Ph.D., za vřelý přístup, cenné rady a věnovaný čas. Dále děkuji celému týmu CLIP, díky kterému mám tu možnost nahlédnout pod pokličku diagnostiky a výzkumu léčby dětských leukemií. V neposlední řadě děkuji mé rodině a přátelům za jejich neutuchající podporu po celou dobu mého studia. Velice si toho vážím.

Abstrakt

Účinky cílené terapie v léčbě nádorových onemocnění jsou intenzivně zkoumány a testovány v mnoha klinických studiích. Na rozdíl od klasické chemoterapeutické léčby by cílená terapie měla na nádorové buňky působit specificky, s omezenou toxicitou a nižším rizikem vedlejších účinků. Jeden z typů cílené terapie využívá Achillovu patu rakoviny – specifika nádorového metabolismu. Se znalostmi metabolických odlišností nádorových a normálních buněk lze nastavit podmínky, které normální buňky snadno překlenou, zatímco nádorové buňky v jejich důsledku odumírají. Toho lze dosáhnout odstraněním některých aminokyselin z extracelulárního prostředí, na kterém jsou nádorové buňky závislé. Proslulým a po mnoho let terapeuticky využívaným enzymem je asparagináza. Asparaginázová terapie je ale úspěšná jen u některých druhů rakoviny, proto je zapotřebí další vývoj a také hledání enzymů s obdobnými účinky. V průběhu let byly objeveny další čtyři enzymy, které by se v budoucnu mohly stát nedílnou součástí léčby onkologických pacientů – arginindeimináza, argináza, methionináza a cyst(e)ináza. Minulé a současné studie zkoumají jejich účinky na nádorové buňky *in vitro* a *in vivo*. Úspěšná likvidace nádorových buněk s sebou často přináší limity v podobě imunogenicity a rezistence. S každou další studií tak přicházejí odpovědi, ale i další výzvy, se kterými je potřeba se vypořádat, pokud tyto enzymy mají lidstvu pomoci s jedním z nejobávanějších onemocnění posledních desítek let.

Klíčová slova: cílená terapie, nádorový metabolismus, asparagináza, arginindeimináza, argináza, methionináza, cyst(e)ináza

Abstract

The effects of targeted therapies in the treatment of cancer have been extensively researched and tested in many clinical trials. In contrast to conventional chemotherapy treatment, targeted therapy should act specifically on cancer cells with limited toxicity and lower risk of side effects. One type of targeted therapy exploits the Achilles heel of cancer - the specificity of tumour metabolism. With knowledge of the metabolic differences between tumor and normal cells, we can set up conditions that normal cells easily bridge, while tumor cells die as a result. This can be achieved by removing certain amino acids from the extracellular environment on which cancer cells depend. A well-known enzyme that has been used therapeutically for many years is asparaginase. However, asparaginase therapy is only successful in some cancers, so further development is needed, as well as the search for enzymes with similar effects. Over the years, four other enzymes that could become an integral part of the treatment of cancer patients in the future have been discovered – arginine deiminase, arginase, methioninase and cyst(e)inase. Past and current studies have investigated their effects on cancer cells *in vitro* and *in vivo*. Successful elimination of cancer cells often comes with limitations as immunogenicity and resistance. With each new study come new answers, but also more challenges we need to deal with if these enzymes would help to fight off one of the most feared diseases of the last few decades.

Key words: targeted therapy, cancer metabolism, asparaginase, arginin deiminase, arginase, methioninase, cyst(e)inase

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Metabolismus nádorových buněk	2
2.1	Glutamin v nádorovém metabolismu	2
3	Asparagin	4
3.1	Asparagin syntetáza.....	4
3.2	Asparagináza	5
3.2.1	Asparaginázová terapie	6
3.2.1.1	Glutaminázová aktivita asparaginázy	8
3.2.1.2	Limity asparaginázové terapie	9
4	Arginin	11
4.1	Metabolismus argininu	11
4.2	Dráha arginin – oxid dusnatý	13
4.3	Vhodní kandidáti pro terapie s arginin-depletujícími enzymy	13
4.4	Arginindeimináza	14
4.4.1	Arginindeiminázová terapie.....	14
4.4.1.1	Limity arginindeiminázové terapie	15
4.5	Argináza	16
4.5.1	Arginázová terapie	16
4.5.1.1	Limity arginázové terapie	17
5	Methionin	17
5.1	Hoffmanův efekt.....	18
5.2	Methionináza	19
5.2.1	Methioninázová terapie.....	19
5.2.1.1	Limity methioninázové terapie	20
6	Cystein.....	21
6.1	Vztah nádorových buněk k cysteinu.....	22
6.2	Cyst(e)ináza.....	23
6.2.1	Cyst(e)inázová terapie.....	23
6.2.1.1	Limity cyteinázové terapie.....	24
7	Závěr	25
8	Seznam literatury	26

Seznam zkratek

ADC – arginindekarboxyláza	iPSC – pluripotentní kmenové buňky
ADI – arginindeimináza	METáza – methionináza
ADI-PEG20 – arginindeimináza s připojeným polyethylenglykolem	MS – methioninsyntáza
ALL – akutní lymfoblastická leukemie	MTA – metylthioadenosin
AML – akutní myeloidní leukemie	MTAP – metylthioadenosinfosforyláza
ARG – argináza	mTOR – savčí kináza (z angl. <i>mammalian target of rapamycin</i>)
ARG1 – argináza 1	NOS – syntázy oxidu dusnatého
ARG2 – argináza 2	o-rMETáza – orálně podávaná rekombinantní forma methioninázy
ASL – argininosukcinátlyáza	OTC – ornitintraskarbamoyláza
ASNáza – asparagináza	PDOX (modely) – imunodeficientní humanizované modely s nádorovými buňkami pacienta transplantovanými do místa obvyklého výskytu daného typu buněk (z angl. <i>patient-derived orthotopic xenograft</i>)
ASNS – asparaginsyntetáza	PDX (modely) – imunodeficientní humanizované modely s transplantovanými nádorovými buňkami pacienta (z angl. <i>patient-derived xenografts</i>)
ASS1 – argininosukcinátsyntáza 1	PEG – polyethylenglykol
ATP – adenosintrifosfát	PEG-EcA – asparagináza typu I s připojeným polyethylenglykolem
BSO – buthioninsulfoximin	PLP – pyridoxalfosfát
CGL – cystathion- γ -lyáza	rMETáza – rekombinantní forma rMETázy
CLL – chronická lymfocytární leukemie	ROS – reaktivní formy kyslíku
CpG – cytosin-fosfát-guanin	SAM – S-adenosylmethionin
CSSC – cystin	xCT – antiportér cystin/glutamát
CYSáza – cyst(e)ináza	β AspAMP – β -aspartyl-adenosinmonofosfát
EcA, EcAII – asparagináza typu II pocházející z <i>E. coli</i>	
EcAI – asparagináza typu I pocházející z <i>E. coli</i>	
ErA – asparagináza pocházející z <i>D. dadantii</i>	
ESC – embryonální kmenové buňky	
GSH – glutathion	

1 Úvod

Rakovina patří mezi nejzávažnější onemocnění západní civilizace. Postihuje různé tkáně, od čehož se odvíjí prognóza a postup léčby, přičemž velké množství případů je stále nevléčitelných. Z dat Českého statistického úřadu z let 2010 až 2019 vyplývá, že zhoubné nádory stály na druhé příčce v žebříčku příčin úmrtí Čechů, hned po kardiovaskulárních chorobách.

Mezi charakteristické rysy nádorových buněk patří masivní růst, tvorba metastáz, nestabilní genom, nekontrolovatelné a časté dělení s neomezeným počtem opakování, nezávislost na vnějších signálech organismu a potlačení indukce apoptózy. Dalším důležitým nedávno popsaným rysem nádorových buněk je deregulace bioenergetických a biosyntetických procesů. Detailní zkoumání buněčného metabolismu nádorových buněk nám přináší nové poznatky o jeho specifickém fungování, a tím i nástroje využitelné při vývoji efektivní terapie, která bude na tyto buňky selektivně působit.

Právě metabolické odchylky od normálu, které nádorovým buňkám poskytují určité výhody, se dají otočit v jejich neprospěch. Transformací nádorového metabolismu došlo k několika zásadním změnám ve vztahu buněk k aminokyselinám. Nádorový metabolismus spotřebovává aminokyseliny ve větším množství, a navíc se na přísunu některých aminokyselin stal přímo závislým. Pro nádorové buňky se tak stávají esenciálními i ty aminokyseliny, které za normálních okolností esenciální nejsou. Některé nádorové buňky mimo tyto změny vykazují menší schopnost si určité aminokyseliny syntetizovat. Těchto jevů využívá cílená terapie, jejímž záměrem je co nejméně negativně ovlivnit normální buňky těla a zároveň co nejvíce poškodit buňky nádorové. Jednou ze strategií je selektivní vyhladovění nádorových buněk, které může být provedeno mnoha způsoby. Pověštinou jsou zaměřeny na blokaci přenašeče aminokyseliny do buňky, inhibici syntetizujícího enzymu nebo vpravení enzymu, který danou aminokyselinu v extracelulárním prostředí degraduje. Právě těmto typům enzymů se věnuje tato práce.

2 Metabolismus nádorových buněk

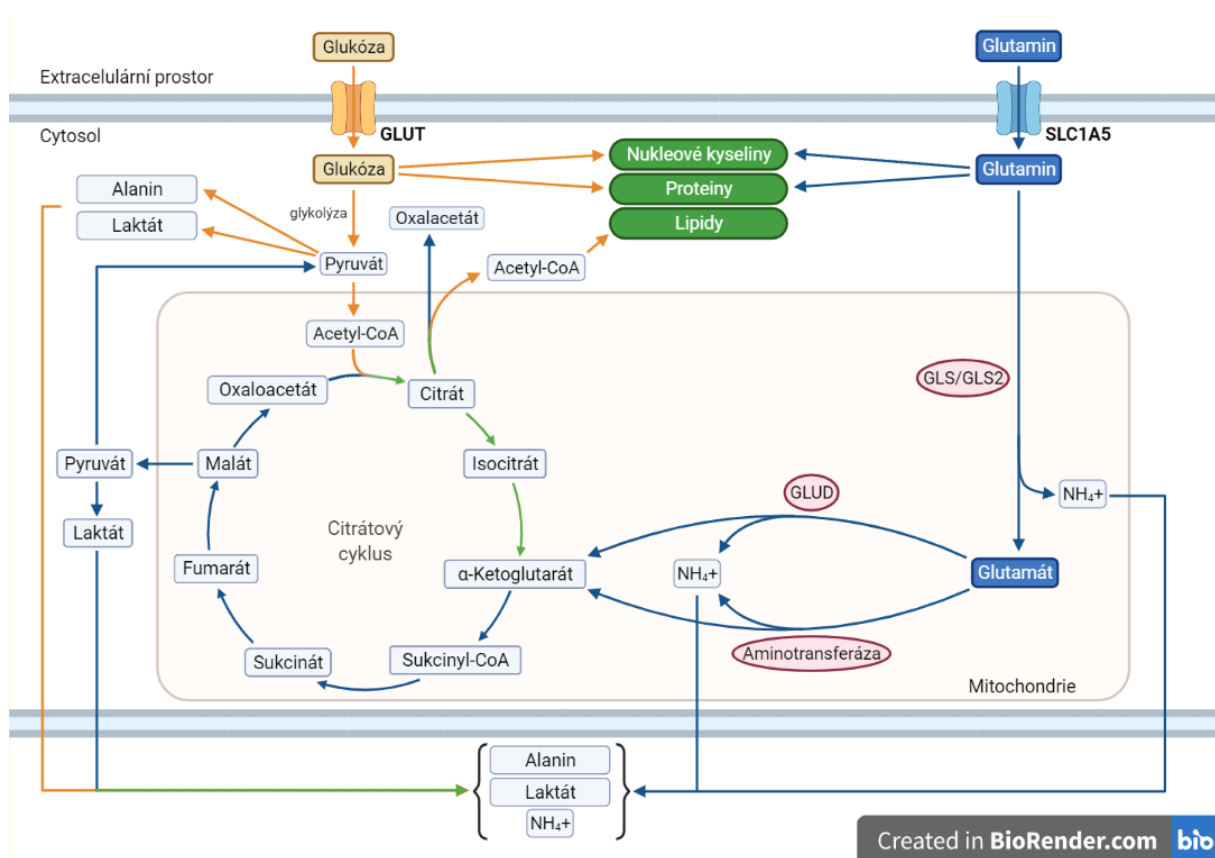
Nádorové buňky potřebují velké množství energie. Nejvíce energie ve formě adenosintrifosfátu (ATP), konkrétně 36 molekul, mohou buňky získat rozkladem glukózy za aerobních podmínek neboli buněčným dýcháním. Nádorové buňky přednostně využívají tzv. aerobní glykolýzu, kterou urychlily jejím odpražením od respirace. Intenzivní přeměna glukózy na laktát, která probíhá v nádorových buňkách bez ohledu na přítomnosti i kyslíku je známa jako Warburgův efekt. Nádorové buňky tento způsob získávání energie preferují, a jelikož na jednu molekulu glukózy získají touto aerobní glykolýzou méně ATP, přijímají glukózu ve větším množství při srovnání s normálními buňkami těla. Nadbytečné molekuly laktátu a dalších kyselých metabolitů jsou vylučovány do extracelulárního prostředí, čímž dochází ke snížení pH v okolí buňky, což napomáhá buňkám invadovat do dalších částí těla a znesnadňuje její případnou likvidaci imunitním systémem.

Jednou z výhod, kterou Warburgův efekt přináší, je kontinuální přísun energie i přes nedostatečné okysličení tkáně. Navzdory schopnosti nádorových buněk stimulovat tvorbu nových kapilár, angiogeneze často neudrží krok s rychlým tempem růstu nádoru. Současné studie poukazují na to, že Warburgův efekt napomáhá v nádorových buňkách nejen při získávání energie, ale také se účastní nekontrolovaného růstu spuštěním biosyntetických drah. Tyto procesy jsou součástí tzv. *branching pathways*, ve kterých intermediáty glykolytické dráhy vstupují do vedlejších reakcí a účastní se syntézy aminokyselin, nukleotidů a lipidů. Příkladem je pentózofosfátový cyklus, jehož produktem je ribóza-5-fosfát využívaná při syntéze nukleotidů, anebo dráha biosyntézy serinu. Tato aminokyselina se uplatňuje jako prekurzor purinů a pyrimidinů.

2.1 Glutamin v nádorovém metabolismu

Nádorové buňky spotřebovávají kromě glukózy ve vyšším množství také lipidy a aminokyseliny, ze kterých je pro ně nejdůležitější glutamin. Jelikož glukóza je přednostně metabolizována na laktát, a tím do citrátového cyklu vstupuje méně pyruvátu, je glutamin využíván k doplnění chybějících meziproductů citrátového cyklu skrze α -ketoglutarát. Glutamin je zásadní pro udržení dusíkové homeostázy a syntézu proteinů, nukleotidů, koenzymů a antioxidantů. Antioxidanty pomáhají buňkám se vypořádat s oxidačním stresem, jemuž jsou nádorové buňky vystaveny ve vyšší míře kvůli zrychlení metabolismu. Glutamin proto společně s glukózou stojí v pomyslném středu nádorového metabolismu.

Velké množství nádorových buněk je na přísunu glutaminu závislých (Eagle, 1955). Kdežto normálním buňkám těla, pokud nejsou vystaveny katabolickému stresu, stačí jeho endogenní syntéza (Cha et al., 2015; Tsujimoto et al., 2015; Ziegler et al., 2005). Na základě těchto zjištění je postavena cílená terapie využívající inhibitory strategických enzymů glutaminového metabolismu. První aminoskupinu z glutaminu odštěpují glutaminázy (GLS, GLS2), čímž vytváří glutamát. Druhá aminoskupina je z glutamátu odštěpena aminotransferázami nebo glutamátdehydrogenázou (GLUD) za vzniku α -ketoglutarátu. Inhibován může být i membránový transportér glutaminu do buňky, SLC1A5. Účinky inhibitorů jsou v posledních letech intenzivně zkoumány.



Obr. 1: Nádorový metabolismus glutaminu a glukózy. Nádorové buňky přijímají velké množství glukózy a glutaminu. Vstup do buňky glukóze umožňují transportéry GLUT. Glukóza je glykolýzou metabolizována na pyruvát. Většina vytvořeného pyruvátu je přeměněna na alanin nebo laktát a transportována ven z buňky. Menší část vstupuje do citrátového cyklu, díky kterému mohou být syntetizovány lipidy. Glutamin je do buňky transportován díky transportéru SLC1A5. V mitochondrii jsou z něj odštěpeny obě aminoskupiny, nejprve enzymem GLS nebo GLS2 a posléze enzymem GLUD nebo aminotransferázami. Vzniklý α -ketoglutarát rozbíhá zbylou část citrátového cyklu. Aminoskupiny jsou stejně jako alanin s laktátem transportovány ven z buňky, čímž dochází k okyselení vnějšího prostoru nádorové buňky.

3 Asparagin

Asparagin je neutrálně nabitá aminokyselina s polární aminoskupinou v postranním řetězci. V organismu je využíván k proteosyntéze a N-glykosylaci proteinů, a tedy k vytváření glykoproteinů. Jelikož funguje jako výměnný faktor především serinu, argininu a histidinu, podílí se na homeostáze aminokyselin (Krall et al., 2016). Figuruje také v metabolismu amoniaku a syntéze nukleotidů. V neposlední řadě dokáže potlačit apoptózu skrze svůj vliv na endoplazmatické retikulum (Zhang et al., 2014).

Buňky si dokážou asparagin syntetizovat *de novo*, a tak není řazen mezi esenciální aminokyseliny. Biosyntéza vychází z oxaloacetátu, intermediátu citrátového cyklu. Připojením aminoskupiny glutamátu k oxaloacetátu vzniká α -ketoglutarát a aspartát. Asparagin vzniká v dalším kroku přenesením aminoskupiny z glutaminu na aspartát. Metabolismus asparaginu a glutaminu se tedy do značné míry prolíná.

3.1 Asparagin syntetáza

Asparagin je v savčích buňkách syntetizován enzymem asparaginsyntetázou (ASNS). ASNS je ATP dependentní aminotransferáza, která přenáší aminoskupinu glutaminu na aspartát, čímž vzniká asparagin a glutamát. Má dvě aktivní místa a katalyzuje tři odlišné reakce (Larsen et al., 1999). V prvním aktivním místě na C-koncové doméně dochází k aktivaci karboxylové skupiny v postranním řetězci aspartátu, k tomu je nutná přítomnost ATP a hořečnatých kationtů. Karboxylová skupina aspartátu napadne α -fosfátovou skupinu ATP, čímž dojde k odštěpení dvou fosfátových skupin z ATP ve formě pyrofosfátu a vzniku meziprojektu β -aspartyl-adenosinmonofosfátu (β AspAMP). Thiolová skupina cysteinu na N-konci druhého aktivního místa hydrolyzuje glutamin tak, že se odštěpí aminová skupina glutaminu ve formě amoniaku za vzniku glutamátu. Odštěpená aminoskupina je poté transportována intramolekulárním kanálem k aktivnímu místu na C-koncové doméně obsahujícímu meziprojekt β AspAMP, kde amoniak nukleofilně atakuje elektrofilní β AspAMP za vzniku asparaginu (Larsen et al., 1999). ASNS je v hojném množství produkována buňkami slinivky, mozku, štítné žlázy a varlat, naopak buňky ledvin ji exprimují po málu.

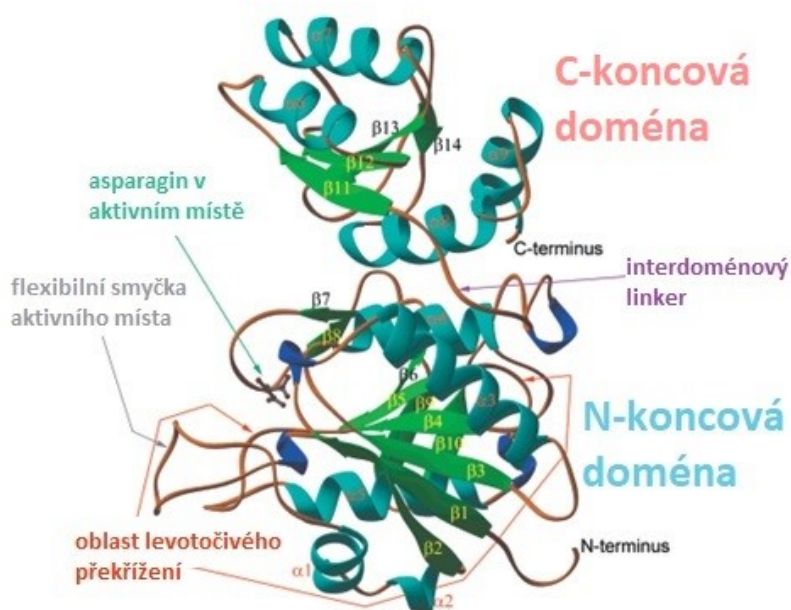
3.2 Asparagináza

Asparagináza (ASNáza) byla nalezena v řadě organismů od bakterií, přes kvasinky, rostliny a ptáky až k savcům vyjma člověka. Ne všechny přirozeně se vyskytující ASNázy ale disponují protinádorovými schopnostmi. Povětšinou má ASNáza strukturu tetrameru, ale je možné ji najít i ve formě monomeru, dimeru a hexameru. ASNázy využívané v terapii jsou purifikované především z bakterií *Escherichia coli* a *Dickeya dadantii*, tyto ASNázy mají stejnou trojrozměrnou strukturu (Lubkowski et al., 2003).

ASNáza pocházející z bakterie *D. dadantii* (ErA), dříve známé pod jmény *Erwinia chrysanthemi* a *D. chrysanthemi*, je klasifikována jako tetramer nebo také dimer dimerů, kde oba dimery obsahují identické monomery. Monomery mají dvě domény – velkou N-doménu a menší C-doménu (Aghaiypour et al., 2001). Aktivní místa enzymu se nachází mezi dvěma protilehlými monomery, dohromady jsou čtyři a mají podobu flexibilní smyčky, která v aktivním stavu enzymu překrývá jeho aktivní místo (Aghaiypour et al., 2001).

ASNáza využívá ping-pongového mechanismu, při kterém dochází ke sledu dvou nukleofilních substitucí, kdy první je způsobena nukleofilním atakem threoninového zbytku a druhá nukleofilním atakem vody. Výsledkem je hydrolytická deaminace – ASNáza odštěpí aminoskupinu z postranního řetězce asparaginu, čímž vzniká aspartát a amoniak (Aghaiypour et al., 2001). Kromě asparaginu může ASNáza jako substrát využít i glutamin, u kterého stejně jako u asparaginu odštěpí amoniak a vzniká tak glutamát. ASNáza může mít kromě asparaginázové aktivity i aktivitu glutaminázovou.

Gramnegativní bakterie *E. coli* syntetizuje dva izoenzymy ASNázy – v cytosolu ASNázu typu I (EcAI) a v periplazmatickém prostoru ASNázu typu II (EcAII, EcA) (Campbell et al., 1967). EcAII na rozdíl od EcAI vykazuje protinádorové účinky a má také vyšší afinitu k substrátům (Campbell et al., 1967; Whitecar et al., 1970). Rozdílná afinita ASNázy k substrátům je dána také flexibilitou smyčky v aktivním místě. Když byla tato smyčka upevněna vodíkovými můstky, glutaminázová a asparaginázová aktivita enzymu se zvýšila (Offman et al., 2011). Mezi aktivními místy EcAI a EcAII je ještě jeden rozdíl, který vysvětluje jejich odlišnost v afinitě ke glutaminu. EcAII obsahuje v aktivním místě zbytek serinu a kyseliny glutamové, ta je záporně nabitá, a tím pádem ochotně přitahuje kladně nabitou α -aminoskupinu glutaminu, zatímco v aktivním místě EcAI se nachází glutaminový a asparaginový zbytek (Aghaiypour et al., 2001).



Obr. 2: Monomer asparaginázy. Monomer se skládá z malé C-domény a velké N-domény. Asparagináza má asparaginázovou a glutaminázovou aktivitu. Pokud se asparagin nebo glutamin dostane do aktivního místa, flexibilní smyčka aktivního místa překryje. V aktivním místě poté dochází k odštěpení aminoskupiny a vzniku aspartátu nebo glutamátu. Převzato a upraveno z Aghaiypour et al., (2001).

3.2.1 Asparaginázová terapie

Asparaginázová léčba primárně cílí na nádorové buňky, které exprimují gen pro ASNS buď jen velmi málo, nebo ho neexprimují vůbec. To je pravděpodobně způsobeno hypermetylací cytosin-fosfát-guaninových (CpG) ostrůvků promotoru genu ASNS (Ding et al., 2005). Dalšími vhodnými buněčnými kandidáty mohou být buňky, které sice ASNS tvoří, ale její aktivita je nižší, to lze pozorovat u buněk rakoviny vaječníků (Krall et al., 2016; Purwaha et al., 2014; Story et al., 1993). V důsledku výše zmíněného si tyto nádorové buňky nedokážou asparagin syntetizovat samy v takové míře, ve které ho potřebují k zajištění základních funkcí a k proliferaci, a jsou tak závislé na jeho extracelulárních zdrojích. Jedním z mechanismů, které se v auxotrofních nádorových buňkách po depleci asparaginu s glutaminem rozbíhají, je inhibice dráhy mTOR, jež má za následek potlačení proteosyntézy, nukleových kyselin, zastavení buněčného cyklu ve fázi G₁, aktivaci autofagie a následně apoptózu. Působením ASNázy dochází také k metabolickému přeprogramování, konkrétně ke změnám bioenergetických drah, a to buď přímo, nebo nepřímo, což je regulováno drahou mTOR (Hermanova et al., 2016; Leslie et al., 2006; Yu et al., 2012).

ASNáza je pacientům podávána od 70. let 20. století a v současné době se jedná o nejpoužívanější cytostatický enzym, co se klinické onkologie týče. Standardně je využívána v léčbě leukemií a některých druhů non-Hodgkinova lymfomu a tvoří hlavní složku medikamentů podávaných dětským pacientům s lymfoblastickou leukemií (Pieters et al., 2011). Vpravuje se injekčně nejčastěji do žíly nebo svalu. Může být aplikována i do páteřního kanálu, protože při běžném podání neprochází hematoencefalickou bariérou (Capizzi et al., 1970). V Evropě je většině pacientů podávána nitrožilně, zatímco ve Spojených státech se aplikuje do svalu. V rámci léčby akutní lymfoblastické leukemie (ALL) byly sledovány rozdíly působení ErA při podávání oběma způsoby. Bylo zjištěno, že intramuskulárně injektovaná ErA vykazuje vyšší aktivitu (Schrey et al., 2010).

Průběh asparaginázové léčby se liší dle zdroje enzymu. Primárně je k terapii využívána EcA, ale pokud se u pacientů objeví alergické reakce, přechází se na ErA. ErA vykazuje při stejném dávkování méně vedlejších účinků jako neurotoxicitu, pankreatitidu a sepsi nežli EcA, avšak její aktivita je nižší a anafylaktickou reakci mohou vyvolat obě se stejnou pravděpodobností (Duval et al., 2002). Biologický poločas rozpadu EcA se pohybuje kolem 1,24 dne, což je téměř dvojnásobek biologického poločasu rozpadu ErA, který činí zhruba 0,6 dne, a tím pádem se ErA musí pacientům podávat častěji (Müller and Boos, 1998).

Ve snaze zamezit alergickým reakcím byla EcA upravena pomocí PEGylace. Při procesu PEGylace je na ASNázu kovalentně připojen polyethylenglykol (PEG). PEGylovaná molekula se poté stává více stabilní, čímž se zvyšuje biologický poločas rozpadu molekuly v organismu, je rozpustná v polárních rozpouštědlech a organismus netvoří takové množství protilátek vůči dané molekule. PEGylovaná EcA se může pochlubit vyšší protinádorovou aktivitou a biologickým poločasem rozpadu kolem 5,73 dne, což je od její nativní formy s poločasem rozpadu 1,24 rozdíl 4,49 dne (Müller and Boos, 1998). Vyšší aktivita a prodloužení cirkulace PEG-EcA v plazmě umožňuje nižší frekvenci dávkování, a tím klesají i možné vedlejší účinky. V případě, že se u pacienta léčeného v Evropě objeví imunitní odpověď na EcA, přejde se na léčbu pomocí její PEGylované formy nebo pomocí ErA. Až třetina pacientů vykazujících alergickou reakci na EcA je ale posléze alergických i na ErA (Billett et al., 1992; Vrooman et al., 2010). Ve Spojených státech se primárně používá PEG-EcA. Přecitlivělost může nastat i po aplikaci PEGylované formy, organismus vyvine protilátky na PEG, a tím dochází k inaktivaci a odstranění PEG-ASNázy někdy i bez pozorovaných alergických reakcí (Armstrong et al., 2007; van der Sluis et al., 2016). Křížová reaktivita protilátek se vyskytuje při použití nativní a PEGylované formy EcA. Navzdory

vylepšení vlastností EcA PEGylací byla po vykazování vážných vedlejších účinků PEG-EcA u pacientek s rakovinou vaječníků předčasně ukončena II. fáze klinického testování (Hays et al., 2013). Metoda PEGylace byla použita i u ErA, kde také prodloužila poločas rozpadu (Rau et al., 2018; Torres-Obreque et al., 2019). Stejně jako v případě nativních forem intramuskulární aplikace prodlužuje dobu cirkulace enzymu v plazmě, avšak tento způsob aplikace je oproti intravenózní aplikaci pacienty považován za bolestivější, nástup účinku je pomalejší a častěji dochází ke kožním projevům hypersenzitivity (Douer et al., 2007).

3.2.1.1 Glutaminázová aktivita asparaginázy

U klinicky využívaných ASNáz se glutaminázová aktivita v porovnání s asparaginázovou aktivitou pohybuje kolem 5 % (Wriston and Yellin, 1973); u některých ASNáz může dokonce asparaginázovou aktivitu převyšovat. Zdá se, že glutaminázová aktivita ASNázy výrazně pomáhá při léčbě nádorových buněk, a to nejen těch, které mají sníženou expresi glutaminsyntetázy nebo ji úplně postrádají, což bylo pozorováno například u rakoviny vaječníků, oligodendrogliomu nebo mnohočetného myelomu (Bolzoni et al., 2016; Chiu et al., 2018; Furusawa et al., 2018). Podle některých výzkumů je glutaminázová aktivita ASNázy nezbytná pro efektivitu asparaginázové terapie použité při léčbě ALL (Offman et al., 2011; Panosyan et al., 2004).

Pro lepší pochopení důležitosti role glutaminázové aktivity v asparaginázové terapii byly vyvinuty ASNázy s odlišnou glutaminázovou aktivitou. Enzymy s knock-outovanou glutaminázovou aktivitou byly v boji s nádorovými buňkami neexprimujícími ASNS stále účinné (Parmentier et al., 2015). V další studii, ve které byly použity enzymy s nižší a vyšší glutaminázovou aktivitou oproti normálu, byly v léčbě ALL buněk bez ASNS překvapivě nejúčinnější ASNáza, která vykazovala nejvyšší glutaminázovou aktivitu (Offman et al., 2011). Pokud předpokládáme, že nádorové buňky bez ASNS nepoužívají glutamin k syntéze asparaginu, ale k doplňování citrátového cyklu, a tím pádem k proliferaci, je glutaminázová aktivita žádoucí. Vyčerpání cirkulujícího glutaminu ASNázou hraje svou roli i u nádorových buněk, které ASNS exprimují, jelikož jim glutamin slouží jako donor aminoskupiny při syntéze asparaginu a dalších produktů (Ratnikov et al., 2015) a bez přístupu k endogennímu glutaminu podléhají apoptóze (Krall et al., 2016). Další výzkumy ukazují přímou úměru mezi cytotoxickým působením na nádorové buňky obsahující ASNS a glutaminázovou aktivitou, jelikož cytotoxicita se objevovala a zvyšovala přímo úměrně glutaminázové aktivitě enzymu (Chan et al., 2014; Parmentier et al., 2015).

Vzhledem k významným rolím, jaké glutamin v organismu sehrává, může jeho deplece představovat problém. Obavy z poškození metabolismu způsobeného nedostatkem glutaminu v průběhu asparaginázové terapie vedly k metodě suplementace. Názory na tuto strategii se však liší. Některé studie popisují výhody doplňování glutaminu během léčby ALL a během chemoterapie (Sands et al., 2017; Tanaka et al., 2016; Vicentini et al., 2016), jiné jeho suplementaci neshledávají přínosnou (Moe-Byrne et al., 2012; Tao et al., 2014).

3.2.1.2 Limity asparaginázové terapie

Glutaminázová aktivita sice může být důležitou součástí asparaginázové léčby, ale má i svou stinnou stránku, které je třeba se vyvarovat. V I. fázi klinického testování ASNázy s vyrovnanou glutaminázovou a asparaginázovou aktivitou (někdy také označovaná jako glutamináza-asparagináza) u dospělých onkologických pacientů bylo pozorováno velké množství vedlejších účinků zahrnujících hyperglykémii, respirační alkalózu, nevolnost, zvracení, zimnici anebo naopak horečku. Navíc terapie vedla k projevům jako asterixis, letargie a dezorientace, které vypovídají o zasažení funkcí centrální nervové soustavy (Warrell et al., 1980). Na základě tohoto pozorování se k II. fázi klinického testování už nepřistoupilo. I když klinicky využívané EcA a ErA disponují glutaminázovou aktivitou jen v řádu několika procent, mohou vyvolat mnohé vedlejší účinky jako například hypersenzitivní a anafylaktické reakce, pankreatitidu, trombózu, zvýšení krvácivosti, bolesti břicha, horečku, infekce, hyperglykémii, sepsi a krvácivé cysty (Avramis et al., 2002; Haskell et al., 1969; Oettgen et al., 1970; Plourde et al., 2014; Vrooman et al., 2016). Problémy spojené s koagulací krve jsou dány ovlivněním proteosyntézy (Nowak-Göttl et al., 2001). Celkově je léčba dětských onkologických pacientů asparaginázou úspěšnější než léčba dospělých, množství vedlejších účinků totiž koreluje s věkem pacienta (Stock et al., 2011).

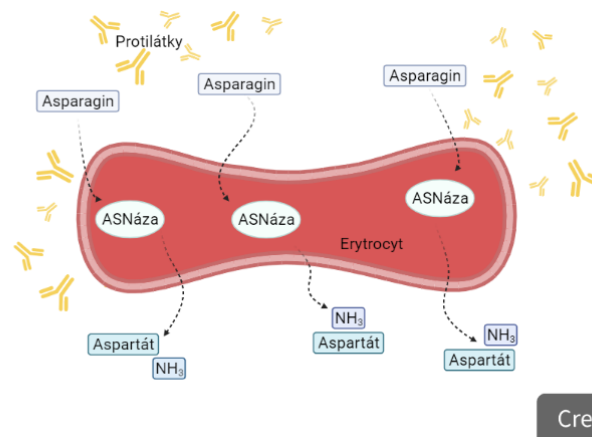
Výzkumy se začaly ubírat směrem k produkci terapeuticky využitelné ASNázy se sníženou glutaminázovou aktivitou (Chan et al., 2014; Reinert et al., 2006). Minimalizování vedlejších účinků způsobených glutaminázovou aktivitou ErA může být dosaženo skrze záměnu aminokyselinových zbytků aktivního místa enzymu. Pokud je ve flexibilní smyčce mutantní ErA nahrazen jeden ze dvou aminokyselinových zbytků zbytkem glutaminovým, je α -aminoskupina glutaminu silně odpuzována donory vodíkových vazeb. Asparagin se díky menší velikosti stále dokáže vyhnout donorům vodíkových vazeb, a tak dochází ke snížení afinity ke glutaminu (Nguyen et al., 2016). Jiná výzkumná skupina vytvořila mutantní enzym bez detekovatelné glutaminázové aktivity, který byl shledán účinným v likvidaci nádorových

buněk schopných syntézy asparaginu (Chan et al., 2014). Další možností je použití ASNázy přirozeně se vyskytující u jiných organismů než u bakterií *E. coli* a *D. dadantii*. Alternativní ASNáza má ale většinou nižší asparaginázovou aktivitu a při pokusech o její zvýšení došlo ke zvýšení obou aktivit enzymu, čímž by ASNáza ztratila jednu ze svých výhod (Sudhir et al., 2016).

Druhou výhodou ASNázy z alternativních zdrojů je možnost jejich využití, pokud u pacienta dojde k imunitním reakcím na EcA či ErA. Jako alternativní zdroje se nabízejí především houby (Huang et al., 2014; Mohan Kumar and Manonmani, 2013; Vala et al., 2018), rostliny (Liu et al., 2019), kvasinky (Darvishi et al., 2019) či jiné druhy bakterií (El-Naggar et al., 2016; Reinert et al., 2006). Enzymy původem z jiných organismů, než do kterého jsou aplikovány, nebývají zpravidla dobře přijímány, a tak byla vyvinuta i z části lidská a z části morčecí ASNáza (Rigouin et al., 2017). Do I. fáze klinického testování však zatím nebyla přijata ani jedna ASNáza z alternativního zdroje.

Snížení efektivity nebo dokonce rezistence vůči asparaginázové terapii může být způsobeno kooperací nádorových buněk s adipocyty za účelem zisku glutaminu nebo s mezenchymálními buňkami stromatu pro získání asparaginu (Ehsanipour et al., 2013; Iwamoto et al., 2007; Parmentier et al., 2015). Efektivita léčby proto závisí i na množství tukové tkáně pacienta, což bylo prokázáno na myších modelech, kde asparaginázová léčba neprodloužila život obězním myším. Tato podpora od normálních buněk může vést k neúplné eradikaci leukemické populace a následnému relapsu onemocnění (Williams, 2007).

Zajímavá strategie podávání ASNázy je její vložení do erytrocytů (Kravtsoff et al., 1996; Updike et al., 1976). Skrze cytoplazmatickou membránu erytrocytů je k ASNáze aktivně transportován glutamin a asparagin, které jsou ASNázou degradovány. Tím, že je ASNáza součástí erytrocytu, není napadána imunitním systémem a doba cirkulace v organismu je dána životností erytrocytu, tj. 120 dní. Poločas rozpadu se pohybuje kolem 1 měsíce, což je diametrální rozdíl oproti 0,6 dne ErA, 1,24 dne EcA a 5,73 dne PEG-EcA (Halfon-Domenech et al., 2011; Müller and Boos, 1998). Eryaspáza, ASNáza enkapsulovaná v erytrocytu, v klinických studiích s pacienty trpícími ALL a adenokarcinomem pankreatu s nízkou expresí ASNS vykazovala mnohem menší koagulaci a alergické reakce nežli předchozí varianty enzymu (Bachet et al., 2015; Halfon-Domenech et al., 2011; Hammel et al., 2020; Hunault-Berger et al., 2015).



Obr. 3: Eryaspáza. Asparagin je pumpován skrze membránu dovnitř erythrocytu, kde ho ASNáza rozloží na amoniak a aspartát. Erythrocyt roznáší asparaginázu krevním řečištěm a zároveň ji chrání před napadením imunitním systémem. Výsledkem je snížení toxicity a prodloužení poločasu rozpadu asparaginázy. Inspirováno Thomas and Le Jeune, (2016).

4 Arginin

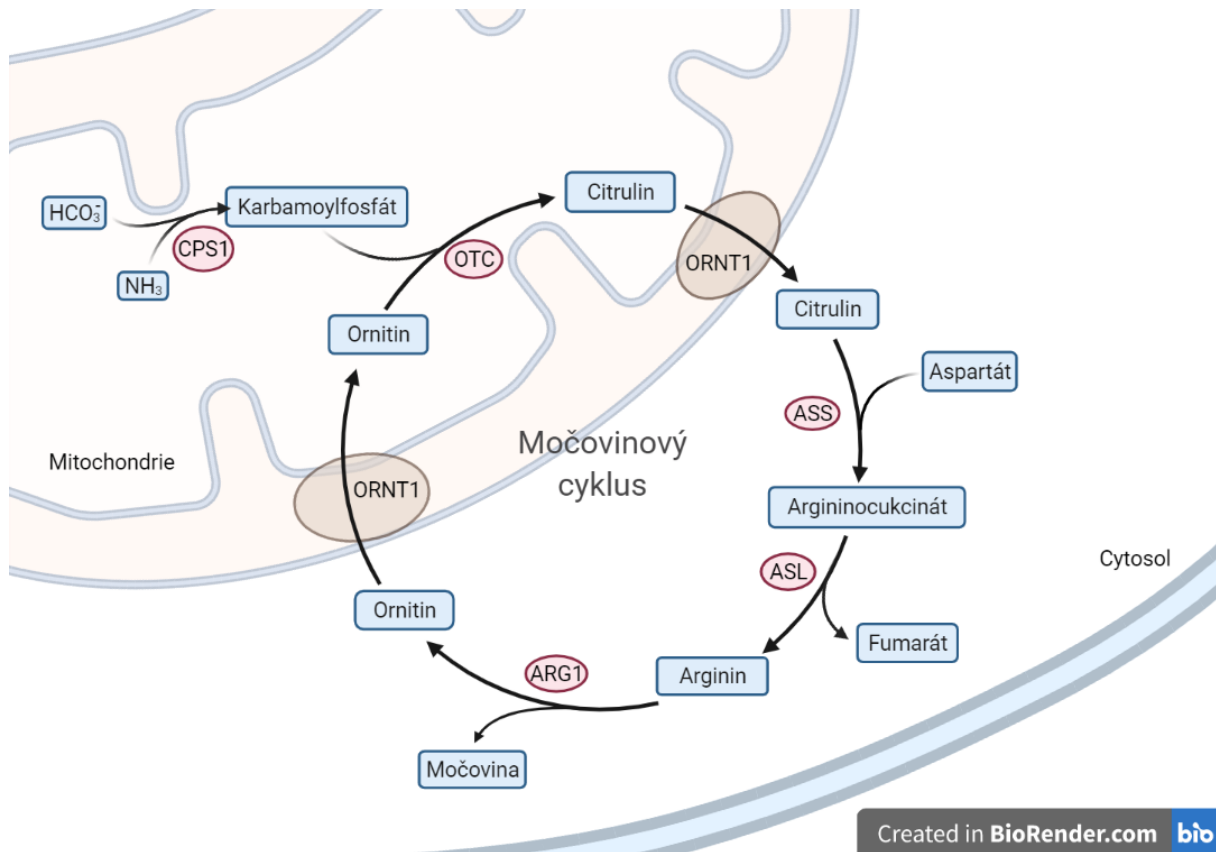
Arginin je proteinogenní aminokyselina, kterou řadíme do skupiny semiesenciálních aminokyselin. Za normálních fyziologických podmínek je jeho endogenní syntéza dostačující, ale při vývoji dítěte nebo katabolickém stresu není organismus schopný arginin syntetizovat do té míry, aby zajistil své fyziologicky správné fungování. Je proto nutné arginin doplňovat přímo ze stravy. Arginin je nedílnou složkou metabolických drah velkého množství pro tělo významných látek jako je například močovina, oxid dusnatý, citrulin, ornitin, prolin, glutamát, kreatinin a agmantin (Morris, 2007).

4.1 Metabolismus argininu

Díky enzymům argininosukcinátsyntáze 1 (ASS1) a argininosukcinátlyáze (ASL) je většina buněk schopna syntetizovat arginin z citrulinu ve dvou krocích. Ústředními místy syntézy argininu v těle jsou játra a ledviny.

Při katabolismu aminokyselin dochází k produkci amonných iontů, které jsou pro lidský organismus toxické i ve velmi malé koncentraci. Amoniak je proto transportován z buněk do krevní plazmy ve formě glutaminu nebo alaninu a následně je krevním řečištěm přenesen do jater. V enterocytech je amoniak z glutaminu a alaninu odštěpen. Karbamoylfosfátsyntetáza (CPS1) v matrix jaterních mitochondrií syntetizuje z amoniaku a hydrogenuhličitanových aniontů karbamoylfosfát za spotřeby dvou molekul ATP. Připojení karbamoylfosfátu na ornitin za vzniku citrulinu katalyzuje ornitintrankarbamoyláza (OTC). Citrulin je

transportován do cytosolu, kde je díky ASS1 spojen s aspartátem, čímž vzniká argininosukcinát. V dalším kroku je působením ASL z argininosukcinátu odštěpen fumarát, a tím dochází k vytvoření argininu. Hydrolytickým štěpením argininu arginázu 1 (ARG1) se z argininu uvolňuje močovina za vzniku ornitinu, který je transportován pomocí translokázy ORNT1 zpět do matrix mitochondrie. Tím se ornitin recykloval a proces se může opakovat. Tento cyklus je nazýván močovinovým a probíhá pouze v játrech.



Obr. 4: Močovinový cyklus v enterocyty. Ornitin je z cytosolu enterocyty přenesen translokázou ORNT1 do matrix mitochondrie. V mitochondrii enzym CPS1 syntetizuje karbamoylfosfát z hydrogenuhličitanových aniontů a amoniaku. Z karbamoylfosfátu a ornitinu vzniká za účasti OTC citrulin, který je transportován do cytosolu, kde je díky ASS spojen s aspartátem, čímž vzniká argininosukcinát. ASL katalyzuje reakci, při níž je z argininosukcinátu odštěpen fumarát za vytvoření argininu. Z argininu vzniká odštěpení močoviny ornitin. Reakci katalyzuje enzym ARG1. Ornitin je znovu transportován do mitochondrie a dochází tak k uzavření cyklu.

Kůra ledvin je místo s nejvyšší koncentrací ASL, a proto není překvapením, že je i místem s nejvyšší syntézou argininu. Citrulin pocházející především ze střev je přenesen do ledvin, kde působením enzymů ASS1 a ASL dochází k jeho přeměně na arginin, který je od ledvin roznášen krevním řečištěm i ke vzdáleným buňkám těla. Na potkaních modelech bylo

zjištěno, že na arginin bylo v proximálním tubulu ledvin ekvimolárně přeměněno přibližně 80 % citrulinu pocházejícího ze střev (Crenn et al., 2008).

4.2 Dráha arginin – oxid dusnatý

Oxid dusnatý, chemickou značkou NO, je velmi malá molekula. Vzhledem k tomu, že má jeden nepárový elektron, patří mezi radikály a jeho biologický poločas rozpadu je 5-10 sekund. Při biosyntéze NO je zapotřebí arginin jakožto výchozí látka v reakci enzymů syntáz oxidu dusnatého (NOS, z angl. *nitric oxide synthase*), které za spotřeby nikotinamidadenindinukleotidfosfátu (NADPH) a kyslíku vytvářejí NO a citrulin. NOS je více typů: eNOS se vyskytují v endotelových buňkách, nNOS v nervových a svalových buňkách. Prostřednictvím iNOS v neutrofilech a makrofázích je v průběhu zánětlivých reakcí tvořen NO za účelem zneškodnit patogenní bakterie v těle. Jelikož NO dokáže volně difundovat skrze cytoplazmatické membrány buněk, je využíván jako signální molekula a neurotransmitter v centrální i periferní nervové soustavě. V procesu buněčné signalizace se NO připojuje na thiolové skupiny cysteinů v proteinech, tzv. N-nitrosylace. Mimo toho NO dokáže relaxovat hladkou svalovinu. NO aktivuje guanylátcyklázu, která štěpí guanosintrifosfát (GTP) na cyklický guanosinmonofosfát (cGMP), což je významný druhý posel. Aktivizací proteinkinázy G dochází k relaxaci myocytu. Uvolněním hladké svaloviny působí mimo jiné na vazodilataci cév, peristaltiku střev, inzulinovou sekreci a erekci penisu. Další důležitou rolí NO v těle je stimulace tvorby nových kapilár, jejichž vznik je zásadní pro zásobování nádoru živinami, a tím pádem nádorový růst.

Ve větších koncentracích je ale NO pro buňky toxický. Problém toxicity NO je řešen skrze enzym ARG1, který katalyzuje přeměnu argininu na ornitin a močovinu. Přítomnost NO má vliv na apoptózu buňky - pokud je hladina NO v buňce nízká, proces apoptózy se nespustí a buňka je tak k apoptóze rezistentní, zatímco vyšší koncentrace NO apoptózu vyvolává (Lind, 2004). NO zajišťuje nádorovým buňkám hned dvě důležité schopnosti – schopnost se vyhnout apoptóze a schopnost indukovat růst kapilár v okolí nádoru.

4.3 Vhodní kandidáti pro terapie s arginin-depletujícími enzymy

ASS1 katalyzuje vznik argininosukcinátu z aspartátu a citrulinu. V některých liniích nádorových buněk jako jsou například buňky hepatocelulárního karcinomu, karcinomu vaječníků, melanomů, mezoteliomu a buněk většiny akutních myeloidních leukemií (AML) je

snížená exprese ASS1 (Dillon et al., 2004; Gupta et al., 2018; Miraki-Moud et al., 2015; Nicholson et al., 2009; Szlosarek et al., 2006; Tan et al., 2014). U nádorových buněk myxofibrosarkomů, které byly výrazně závislé na dodávce argininu z extracelulárního prostředí, byla pozorována hypermetylace ASS1 promotoru (Huang et al., 2013). Ještě lepším ukazatelem pro předpověď účinnosti terapie zahrnující deficit argininu je metylace CpG ostrůvků promotorů genů ASS1 a ASL (Syed et al., 2013). Toto pozorování nasměrovalo výzkum k vývoji cílených terapií využívajících enzymy, které dokážou arginin v krevním séru depletovat. Existuje však jen pět enzymů katabolizujících arginin, a to ARG, NOS, glycinamidinotransferáza (GAT), arginindekarboxyláza (ADC), a arginindeimináza (ADI). Použití ADC v terapii není vhodné, jelikož reakce, při níž vzniká z argininu agmantin není reverzibilní a následná vysoká koncentrace agmantinu je pro okolní tkáň jedovatá. Terapeutický účinek se zatím zkoumá u ADI a ARG.

4.4 Arginindeimináza

Arginindeimináza je enzym, který je produkován některými eukaryoty a bakteriemi. Ve velkém množství ho vytváří bakterie rodu *Mycoplasma*. Do výzkumu terapeutických účinků byla pro své vlastnosti vybrána ADI pocházející z druhu *M. arginini*. Díky arginindeiminázové metabolické dráze si organismy dokážou vyrobit z jednoho molu argininu jeden mol ATP, ADI dráha se tak pro některé z nich stala zásadním zdrojem energie (Zúñiga et al., 2002). ADI katalyzuje reakci, při které se z argininu tvoří citrulin a amoniak. Enzym k sobě nejdříve naváže arginin pomocí polárních interakcí, poté provede nukleofilní atak na C α argininu, následně odštěpí amoniak a přemění tím arginin na citrulin (Das et al., 2004). ADI je prvním enzymem ADI dráhy. Následující druhou reakci katalyzuje enzym OTC, jenž přeměňuje citrulin na ornitin a karbamoylfosfát. V prvním kroku cyklu močoviny a při biosyntéze argininu katalyzuje OTC reverzní reakci, při které vzniká citrulin z ornitinu a karbamoylfosfátu. V posledním kroku ADI dráhy je vzniklý karbamoylfosfát rozložen na amoniak a CO $_2$ karbamátkinázou, která zároveň s touto reakcí fosforyluje ADP na ATP.

4.4.1 Arginindeiminázová terapie

Arginindeiminázová terapie v sobě skrývá velký potenciál. Při zkoumání vlivu ADI na buněčných kulturách akutních leukemií se zjistilo, že ADI má v rámci inhibice proliferace oproti ASNáze menší účinek u buněk myeloidního původu, avšak u buněk původu lymfoidního je účinnější zhruba sto až dvěstě násobně (Gong et al., 2000). Po přidání ADI se

buněčný cyklus nádorových buněk zastavuje ve fázi G₁ nebo S₀ a následně se spouští apoptóza (Gong et al., 2000), kdežto normální buňky se při nedostatku argininu zastavují ve fázi G₁ a po přidání argininu do média jsou schopny dále růst a množit se (Lamb and Wheatley, 2000). Navíc oproti již desítky let zavedené asparaginázové terapii má použití ADI tu výhodu, že nepůsobí na žádnou jinou aminokyselinu nežli arginin (Ensor et al., 2002).

Pro zmírnění imunitních odpovědí a prodloužení biologického poločasu byla vytvořena PEGylovaná forma ADI (ADI-PEG20). Po inkubaci *in vitro* buněk s ADI-PEG20 navýšily expresi ASS1 jak buňky normální, tak buňky AML, což značí snahu obou typů buněk o adaptaci na prostředí s nedostatkem argininu (Miraki-Moud et al., 2015). Navýšením exprese ASS1 sice nádorové buňky dosáhly určitého stupně rezistence, avšak v porovnání s růstem nádoru při dostatku argininu byl nádorový růst v argininovém deficitu znatelně pomalejší (Miraki-Moud et al., 2015). ADI-PEG20 je vhodné používat s dalšími cytostatiky, jelikož při podávání samotné ADI-PEG20 může dojít k rezistenci nádorových buněk na léčbu způsobenou obnovením exprese ASS1 nebo spuštěním dráhy způsobující rezistenci k apoptóze (Tsai et al., 2009). Léčba používající ADI-PEG20 prošla I. a II. fází klinického testování (Izzo et al., 2004; Tsai et al., 2017) a dále byla vyzkoušena i ve III. fázi klinického testování na pacientech s hepatocelulárním karcinomem. U pacientů s pokročilým hepatocelulárním karcinomem, kterým předchází léčba nezabrala, podávání ADI-PEG20 celkové přežití neprodloužilo, avšak u ostatních pacientů se celkové přežití zvýšilo (Abou-Alfa et al., 2018). Na endoteliálních buňkách cév více modelů, včetně buněk z lidské pupečnickové žíly, bylo zjištěno, že ADI má antiangiogenní účinky, což může být následkem její schopnosti rozložit arginin, jenž je prekurzorem proangiogenního NO, nebo následkem prozatím nezjištěné dráhy (Beloussow et al., 2002; Park et al., 2003). Úspěšnost arginindeiminázové terapie se přikládá právě jejímu vlivu na produkci NO, ADI proto zůstává velkou nadějí pro nádorová onemocnění, jako je rakovina prsu, která je na své schopnosti vyvolat angiogenezi závislá.

4.4.1.1 Limity arginindeiminázové terapie

Z enzymů používaných v nejrůznějších terapiích jsou nejlépe tolerovány formy získané z lidských zdrojů. Poněvadž je ADI získávána z bakterií, je při jejím použití více pravděpodobné, že její přítomnost v těle vyvolá nechtěnou imunitní reakci. Míra koncentrace enzymu v plazmě se proto balancuje mezi koncentrací, kdy dojde k navození dostatečně nepříznivých podmínek pro nádorové buňky, a koncentrací, která pro ostatní buňky těla ještě

nebude toxická. Další limit arginindeiminázové terapie může představovat biologický poločas ADI, který činí 4 hodiny, což má vliv na efektivitu léčby (Holtsberg et al., 2002). V nedávné studii byla použita v erytrocytech enkapsulovaná ADI na myších modelech s různými liniemi ASS1 deficientních nádorových buněk, přičemž nebyly pozorovány projevy hypersenzitivity (Gay et al., 2016).

4.5 Argináza

Enzym argináza (ARG) patří mezi enzymy močovinnového cyklu. ARG zajišťuje hydrolytické odštěpení močoviny z argininu za vzniku ornitinu. Zdá se, že ARG je původně bakteriální enzym, který začal být v eukaryotech exprimován až po vzniku mitochondrií (Dzik, 2014). Většina eukaryot exprimuje pouze arginázu 2 (ARG2), která se nachází v mitochondriích (Morris et al., 1997; Samson, 2000). Část eukaryot využívajících močovinu jakožto prostředek pro vyloučení nadbytečného amoniaku exprimuje také cytosolickou izoformu, ARG1, která se vyskytuje zejména v ledvinách (Kepka-Lenhart et al., 2000). Izoformy mají celou řadu společných vlastností – sestávají ze tří identických podjednotek, i když podjednotky se mezi izoformami mírně odlišují, mají stejný reakční mechanismus, pro který je důležitý kofaktor ve formě manganatých kationtů, dále obě potřebují stejné výchozí látky a generují stejné produkty (Jenkinson et al., 1996; Kepka-Lenhart et al., 2000; Morris et al., 1997; Stone et al., 2010a). Při zvýšení aktivity ARG1 dochází k nadměrné depleci argininu a snížení funkce NOS (Kepka-Lenhart et al., 2000). Naopak snížená aktivita ARG1 vede ke strukturálním změnám vaskulatury, a tím ke zvýšenému růstu nádorů (Caldwell et al., 2018).

4.5.1 Arginázová terapie

Dalším slibným arginin-depletujícím enzymem je ARG1. Při použití PEGylované rekombinantní lidské ARG1 *in vitro* bylo zjištěno, že dochází k inhibici proliferace nádorových buněk s nedostatečnou syntézou ASS1 nebo OTC (Ensor et al., 2002). Přednosti arginázové terapie tkví zejména v lidském původu, ale i tak se potýkala s nepříliš dlouhým poločasem rozpadu a nízkou katalytickou aktivitou. Za účelem zvýšení katalytické aktivity byla vyvinuta varianta, která používá jako kofaktor kobaltnaté kationty místo kationtů manganatých (Stone et al., 2010b). Takto modifikovaný enzym ve vyšších dávkách způsoboval nekrózy kostní dřene vedoucí ke smrti myších modelů, což přineslo omezení v jejím případném klinickém využití (Agrawal et al., 2012; Mauldin et al., 2012). Další výzkumy se tak budou zaměřovat na vyvážení účinnosti a toxicity této varianty enzymu.

4.5.1.1 Limity arginázové terapie

K limitům arginázové terapie patří i rezistence. Krátkodobá rezistence nádorových buněk na arginázovou terapii se vyznačuje spuštěním procesu autofagie, kdy se buňky snaží o nahrazení chybějícího argininu z vlastních zdrojů. Tento proces ale není dlouhodobě udržitelný a po vyčerpání intracelulárních zásob se spouští proces apoptózy (Lin et al., 2015; Zeng et al., 2013). Nedostatku argininu v plazmě mohou nádorové buňky odolávat i dlouhodobě. Chybějící živiny včetně aminokyselin si berou od stromálních buněk, které se umí s jejich nedostatkem vyrovnat (Kwong-Lam and Chi-Fung, 2013). Schopnost nádorových buněk získávat chybějící živiny ze stromatu je zásadní pro jejich dynamický růst, avšak snižuje účinnost terapie. Tento problém lze vyřešit podáváním ARG s dalším cytostatikem.

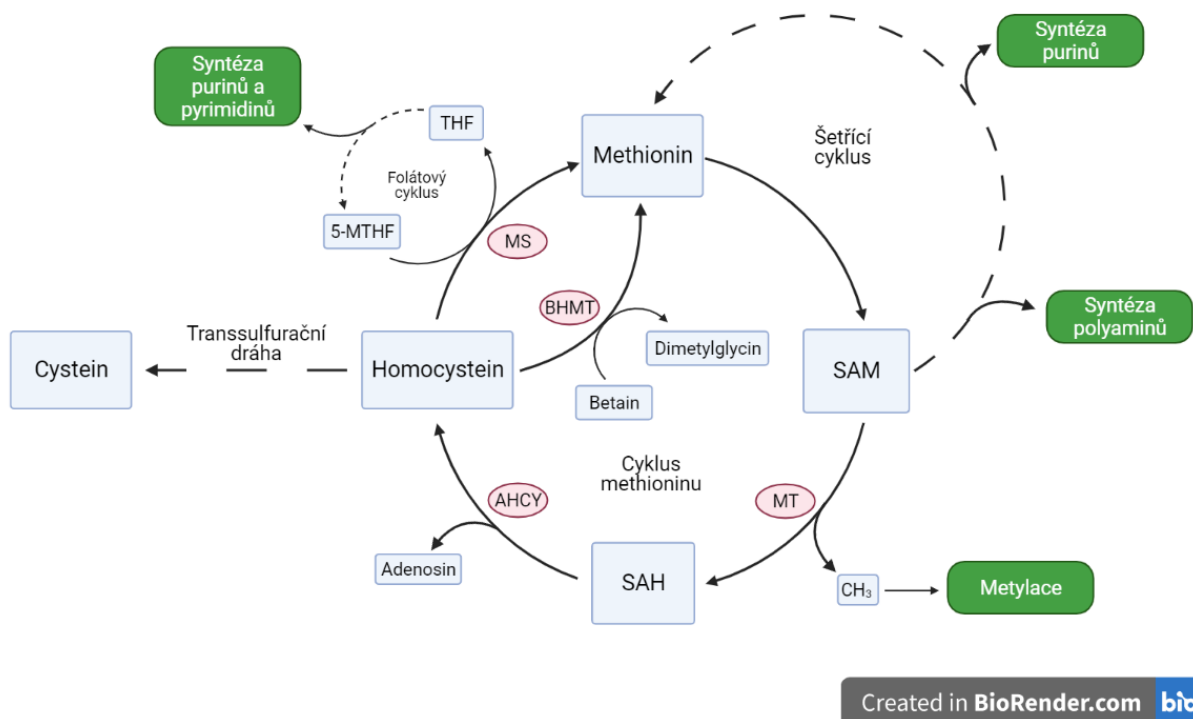
5 Methionin

Methionin je pro savce esenciální aminokyselinou, jež je nutno získat přímo ze stravy, ze které je vstřebáván přes stěnu tenkého střeva. Methionin hraje významnou roli v metabolismu – podílí se na proteosyntéze a je prekurzorem glutathionu (GSH), čímž ovlivňuje homeostázu a odolnost buněk vůči oxidativnímu stresu. Dále je z něj tvořen cystein a polyaminy jako spermin a spermidin, které se účastní karyogeneze a cytogeneze. Připojením adenosylového zbytku ATP k methioninu vzniká S-adenosylmethionin (SAM), který ovlivňuje stabilitu genomu a epigenetické znaky. SAM je pro svou schopnost odevzdat tzv. aktivovanou metylovou skupinu využíván v procesech metylace DNA a syntézy adrenalinu a kreatinu. Právě hypermetylace DNA je výrazným atributem nádorových buněk – jejím následkem se genom stává nestabilním a vznikají aneuploidní karyotypy. Methionin může ovlivnit i syntézu nukleotidů. Společně s cysteinem jsou důležitým zdrojem protonů, a tím pádem i významnými hráči v udržení protonové bilance. Atomy síry, které obě aminokyseliny obsahují, jsou v játrech oxidovány na kyselinu sírovou, z níž se při disociaci na sulfát uvolňují protony.

Lidské tělo si methionin neumí syntetizovat *de novo*, avšak ho dokáže zpětně vyrobit z jeho produktů homocysteinu a SAM třemi různými způsoby. V methioninovém cyklu je ze SAM vytvořen S-adenosylhomocystein (SAH), ze kterého jsou posléze vytvořeny adenosin a homocystein. Methionin vzniká přenesením metylové skupiny 5-metyltetrahydrofolátu (5-MTHF) na homocystein enzymem methioninsyntázou (MS). MS potřebuje jako kofaktor kobalamin neboli vitamin B12 a vyskytuje se ve všech tkáních těla. Methioninu může být ze

SAM syntetizován ještě v šetřícím cyklu, díky kterému mohou být tvořeny puriny a polyaminy.

Homocystein stojí na pomyslné křižovatce v metabolismu methioninu, jelikož z něj může buď být skrze transulfurační dráhu vytvořen cystein, nebo může být dvěma různými reakcemi recyklován zpět na methionin. První z nich je popsána výše. Ve druhé recyklační dráze homocysteinu je pomocí enzymu betain-homocysteinmetyltransferázy (BHMT) v játrech a ledvinách na homocystein přenesena metylová skupina betainu, čímž dochází k vytvoření methioninu.



Obr. 5: Metabolismus methioninu. V methioninovém cyklu vzniká z methioninu nejprve SAM, který je v dalším kroku přeměněn na SAH za odštěpení metylu, který je dále použit v metylačních reakcích. Ze SAH je odštěpen adenosin enzymem AHCY, čímž vzniká homocystein. V poslední reakci methioninového cyklu je na homocystein přenesena metylová skupina buď z betainu pomocí enzymu BHMT, nebo z 5-MTHF díky enzymu MS. 5-MTHF pochází z folátového cyklu, který je důležitý pro syntézu purinů a pyrimidinů. Z homocysteinu může být díky transulfurační dráze vytvořen cystein. Šetřící cyklus zajišťuje syntézu methioninu ze SAM a prekurzory pro polyaminy a puriny. Inspirováno Sanderson et al., (2019) a Parkhitko et al., (2019).

5.1 Hoffmanův efekt

Fakt, že je proliferace nádorových buněk závislá na exogenním přísunu methioninu, byl dokázán již před více než 60 lety (Sugimura et al., 1959). Následující výzkumy především v dalších dvou desetiletích se zabývaly závislostí nádorových buněk přímo na methioninu.

Nádorové i nenádorové buňky byly kultivovány v médiu, ve kterém byl místo methioninu přítomen jeho prekurzor homocystein. Normální buňky tím nebyly výrazně ovlivněny, zatímco drtivá většina buněčných linií různých typů nádorů za těchto podmínek nedokázala proliferovat (Booher et al., 2012; Chello and Bertino, 1973; Halpern et al., 1974; Hoffman and Erbe, 1976; Mecham et al., 1983; Stern et al., 1984). Odlišný metabolismus methioninu nádorových buněk se stal jedním z jejich charakteristických znaků a dnes je znám jakožto Hoffmanův efekt, podle doktora Roberta M. Hoffmana. Hoffmanův efekt je analogický Warburgově efektu a předpokládá se, že by Hoffmanův efekt mohl hrát významnější roli než efekt Warburgův. Nejjednodušší odpovědí na otázku, proč jsou nádorové buňky závislé na exogenních zdrojích methioninu, by byla ta, že nádorové buňky nejsou schopny přeměnit homocystein na methionin (Borrego et al., 2016; Hoffman and Erbe, 1976). Tomu nahrává i skutečnost, že v liniích nádorových buněk závislých na přítomnosti methioninu se MS nesyntetizuje buď vůbec, nebo jen velmi málo (Stern et al., 1984), a stejně tak i MTAP (Carson et al., 1988). Nicméně se zdá, že svou roli v methioninové závislosti nádorových buněk sehraává i zvýšená poptávka po methioninových produktech, ačkoli všechny podrobnosti ohledně Hoffmanova efektu ještě nejsou k dispozici (Booher et al., 2012; Borrego et al., 2016; Lin et al., 2014; Stern et al., 1984). Při nedostatku methioninu se buněčný cyklus nádorových buněk, které mají k methioninu auxotrofní vztah, zastaví v pozdní S/G₂ fázi (Kawaguchi et al., 2018a; Yano et al., 2014, 2016).

5.2 Methionináza

Na základě poznatků Hoffmanova efektu se výzkumy zaměřily na enzym methioninázu (METáza), která je syntetizována bakteriemi a houbami, zatímco v savčích buňkách není přítomna. METáza dokáže specificky štěpit methionin na α -ketobutyrát, metylmerkaptan a amoniak. Funkce METázy je závislá na přítomnosti pyridoxalfosfátu (PLP), jenž jí slouží jako kofaktor. Nejvhodnější vlastnosti pro terapii vykazovala METáza bakterií *Pseudomonas putida*. Její stabilnější rekombinantní formy (rMETáza) je získávána z bakterií *E. coli*, čímž bylo dosaženo větší stability a vyšších výtěžků (Tan et al., 1997a).

5.2.1 Methioninázová terapie

V minulosti proběhly I. fáze klinického testování, které prokázaly účinnost methioninázové terapie s minimální toxicitou (Tan et al., 1996, 1997b). Na několik let pak ale výzkumy utichly. Novější studie ukazují výborné výsledky rMETázy v léčbě melanomů, sarkomů a

osteosarkomů v myších imunodeficientních humanizovaných modelech, kterým byly transplantovány nádorové buňky pacientů (PDX, z angl. *patient-derived xenografts*,) a v modelech, kterým byly buňky pacientů transplantovány přímo do místa obvyklého výskytu daného typu buněk (PDOX, z angl. *patient-derived orthotopic xenograft*,) (Igarashi et al., 2017; Kawaguchi et al., 2018b; Murakami et al., 2017). rMETáza byla podávána do dutiny břišní, skrze pobřišnici se dostala do krevního oběhu, kde došlo k přímé depleci methioninu. Nádory ošetřované tímto způsobem měly nízkou koncentraci methioninu a dorůstaly menší velikosti, což prokázalo vysokou efektivitu rMETázy v inhibici růstu nádorů. Při použití rMETázy v I. fázi klinického testování dokonce nebyla pozorována žádná toxicita (Hoffman et al., 2019).

Až překvapivých výsledků dosahuje orálně podávaná rMETáza (o-rMETáza), u které byla v PDOX myších modelech pozorována ještě vyšší efektivita léčby melanomu, než byla pozorována při injekčním podávání rMETázy (Igarashi et al., 2018a). Účinnost o-rMETázy tkví nejspíše v tom, že depletuje methionin už v gastrointestinálním traktu. Další studie popisují efekt podávání o-rMETázy PDOX modelům s karcinomem slinivky, která má obvykle velmi špatnou prognózu (Igarashi et al., 2018b; Maisonneuve, 2019; Zhu et al., 2018). Zastavení buněčného cyklu v pozdní S/G₂ fázi při podávání METázy činí nádorové buňky mnohem citlivějšími k použití chemoterapie (Kawaguchi et al., 2017). Úspěšnost kombinace methioninázové terapie a chemoterapie byla demonstrována na rakovině slinivky, vaječníků, prostaty, ale i melanomů a sarkomů (Han et al., 2021; Higuchi et al., 2018; Hoffman and Jacobsen, 1980; Igarashi et al., 2018d, 2018c; Kawaguchi et al., 2018e, 2018b, 2018d, 2018c; Sugisawa et al., 2021).

5.2.1.1 Limity methioninázové terapie

Methionin se zdá být významným hráčem v metabolismu indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPSC, z angl. *induced pluripotent stem cells*) i embryonálních kmenových buněk (ESC, z angl. *embryonic stem cell*). Deplece methioninu v exogenním prostředí buněk má za následek rychlé snížení intracelulární koncentrace SAM, což u iPSC a ESC způsobuje diferenciaci a při dlouhodobé deprivaci methioninu buňky podléhají procesům apoptózy (Shiraki et al., 2014). Pro udržení nediferenciovaných pluripotentních kmenových buněk je nezbytné udržet správnou koncentraci SAM. Z těchto poznatků plynou obavy, že by nízký obsah methioninu v krevní plazmě mohl vést ke ztrátě tkáňových kmenových buněk, a tím k narušení homeostázy tkáně. Na druhou stranu velké množství výzkumů dokazuje, že právě

deprivace methioninu působí kladně na délku života zvířecích modelů (Orentreich et al., 1993).

Při použití methioninázové terapie u primátů, konkrétně u samců *Macaca fascicularis*, byly pozorovány vedlejší účinky jako zvracení, anafylaktický šok a také pokles hodnot sérového albuminu a erytrocytů, což ale mohlo být způsobeno častými odběry krve (Yang et al., 2004a). V rámci snahy o eliminaci vedlejších účinků methioninázové terapie byly vyvinuty PEGylované formy rMETázy. Ještě téhož roku, jen o pár měsíců později, vyšla publikace téměř totožného týmu zabývající se jejím použitím opět na samcích *M. fascicularis*. Při porovnání s výsledky předchozí studie se došlo k závěrům, že PEGylovaná forma je vhodnější. U primátů především nevyvolala žádnou imunitní odpověď a dále se PEGylací zvýšil biologický poločas rozpadu enzymu, a to konkrétně z 2,5 hodiny na až 143 hodin (Yang et al., 2004b).

Případná toxicita může být zmírněna souběžným podáváním homocysteinu, vitamínu B12 a folátu, díky čemuž je podpořena syntéza methioninu v nezhoubných buňkách (Epner et al., 2002). Inovativním řešením imunogenicity a krátké cirkulace enzymu je vpravení erytrocytu se zapouzdřenou METázou, erymethionázou. Erytrocyty byly injikovány myším modelům nesoucím buňky karcinomu prsu, adenokarcinomu žaludku a glioblastomu, přičemž došlo k prodloužení aktivity enzymu a k razantní inhibici proliferace nádorů (Gay et al., 2017; Sénéchal et al., 2019).

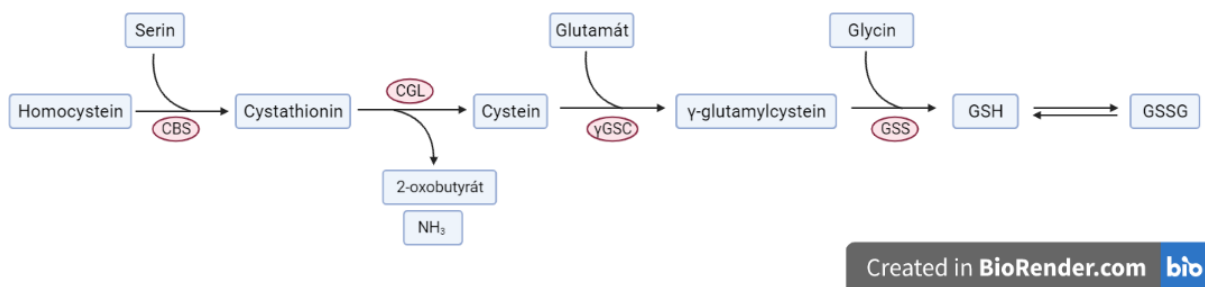
6 Cystein

Mezi podmíněčně esenciální aminokyseliny patří kromě výše zmíněného asparaginu, argininu a glutaminu i cystein. Mezi dvěma sulfanylovými skupinami cysteinů v bílkovinách mohou vznikat disulfidické můstky, které stabilizují konformaci bílkovin. Disulfidické můstky se vyskytují především vně buňky, jelikož extracelulární prostředí má redukční charakter. Spojením dvou cysteinů skrze disulfidický můstek vzniká disulfid cystin (CSSC). Cystein je prekurzorem pro důležité metabolity jako je antioxidant GSH a taurin obsažený ve žlučových kyselinách.

De novo syntéza cysteinu je závislá na metabolismu methioninu. Jak je popsáno výše, v methioninovém cyklu je z methioninu nejdříve vytvořen SAM a poté homocystein. Enzym cystathionin- β -syntáza (CBS), vytvoří cystathionin spojením homocysteinu se serinem. Ve

druhém kroku rozštěpí enzym cystathion- γ -lyáza (CGL) cystathionin na amoniak, 2-oxobutyrát a cystein. Oba enzymy jsou exprimovány v buňkách mnoha lidských tkání (Belalcázar et al., 2014; Persa et al., 2006; Vitvitsky et al., 2006; You et al., 2011).

Jedním z nejvýznamnějších produktů cysteinového metabolismu je GSH, tripeptid složený z glutamátu, glycinu a cysteinu. V prvním kroku syntézy GSH jsou cystein a glutamát spojeny za vzniku γ -glutamylcysteinu v reakci katalyzované enzymem γ -glutamylcysteinsyntetázou (γ GSC). Ve druhém a zároveň posledním kroku enzym glutathionsyntetáza (GSS) připojí k γ -glutamylcysteinu glycin, čímž dochází ke vzniku tripeptidu GSH. GSH má klíčovou roli v udržení redoxní homeostázy a ochraně buněk před oxidačním stresem způsobeným reaktivními formami kyslíku (ROS, z angl. *reactive oxygen species*). Při oxidaci GSH se mezi jeho dvěma molekulami vytvoří disulfidický můstek. Tento dimer se nazývá glutathiondisulfid.



Obr. 6: Metabolismus cysteinu. Homocystein se serinem propojuje enzym CBS za vzniku cystathioninu, ze kterého enzym CGL odštěpí amoniak a 2-oxobutyrát, čímž vytvoří cystein. Cystein reaguje s glutamátem v reakci katalyzované enzymem γ -GSC. Enzym GSS v následující reakci katalyzuje syntézu GSH, ke které dojde spojením γ -glutamylcysteinu s glycinem. Inspirováno Sanderson et al., (2019).

6.1 Vztah nádorových buněk k cysteinu

Kvůli rychlé proliferaci, abnormálnímu růstu a dalším změnám v metabolismu je uvnitř nádorových buněk vysoká hladina ROS (Trachootham et al., 2009). Ve snaze se vyrovnat s oxidačním stresem nádorový metabolismus spotřebovává více GSH, a tím pádem potřebuje i více cysteinu, což může vést až vyčerpání jeho intracelulárních zásob (Dixon and Stockwell, 2014; Harris et al., 2015; Trachootham et al., 2009). Pokud je koncentrace cysteinu v extracelulárním prostředí nízká, nádorový metabolismus nemusí zvýšenou poptávku po GSH pokrýt, čímž je buňka vystavena neblahým účinkům ROS (Cramer et al., 2017; Harris et al., 2015; Trachootham et al., 2009; Zhang et al., 2012). K tomuto jevu přispívá i transkripční

umlcení genů enzymů transsulfurační dráhy v některých liniích hepatocelulárního karcinomu, rakoviny prsu, lymfomů a leukemií (Cramer et al., 2017; Kim et al., 2009; Zhao et al., 2012).

Nádorové buňky se tak staly auxotrofními ve vztahu k cysteinu a je pro ně životně důležité si cystein importovat z extracelulárního prostředí. K tomu využívají především antiportér xCT, který přenáší cystein ve formě CSSC dovnitř buňky, zatímco transportuje glutamát do extracelulárního prostředí a naopak (Doxsee et al., 2007; Shiozaki et al., 2014; Takeuchi et al., 2013; Timmerman et al., 2013; Zhang et al., 2012).

6.2 Cyst(e)ináza

Enzym CGL používá jako kofaktor PLP, a kromě cystathioninu může využít jako výchozí látky svých reakcí i cystein a CSSC. Cystein štěpí za vzniku pyruvátu, amoniaku a sulfanu. CSSC přeměňuje na pyruvát, thiocystein a amoniak. Katalytická účinnost CGL v těchto dvou reakcích je pro využití CGL jakožto terapeutického enzymu nízká. Při bližším prozkoumání struktury CGL bylo zjištěno, že zvýšení reakční rychlosti degradace cysteinu a CSSC by mohlo být dosaženo substitucí Glu59 a Glu339 v aktivním místě enzymu (Cramer et al., 2017). Vyvinutá mutantní forma CGL s pětadvacetkrát vyšší katalytickou účinností při použití cysteinu jako substrátu a padesátinásobně vyšší katalytickou účinností při degradaci CSSC (Cramer et al., 2017). Z mutantní CGL byla pro zlepšení vlastností enzymu vytvořena PEGylovaná forma, která byla pojmenována cyst(e)ináza, někdy je též označována jako CYSáza. Pro zjištění možné cytotoxicity enzymu byla CYSáza podávána dvěma jedincům makaků, kdy došlo k redukci cysteinu a CSSC, zatímco cytotoxické projevy nebyly pozorovány (Cramer et al., 2017).

6.2.1 Cyst(e)inázová terapie

Výše zmíněné abnormality nádorových buněk otvírají pomyslné dveře terapii, která negativně ovlivní buňky nádorové, zatímco na normální buňky nebude mít výraznější vliv. Cílená terapie by nebyla účinná, pokud by se inhiboval pouze transportér xCT, jelikož se v buňkách vyskytují i jiné transportéry schopné přenášet různé formy cysteinu, a proto se výzkum zaměřil na depleci CSSC a cysteinu v exogenním prostředí.

Cyst(e)inázová terapie byla nasazena *in vitro* u buněk rakoviny prostaty. Její účinek se projevil snížením hladiny GSH, zvýšením hladiny ROS, zvýšením fosforylace adenosinmonofosfátem aktivované proteinkinázy (AMPK), snížením fosforylace mTOR a

došlo ke spuštění procesů autofagie (Cramer et al., 2017). Poté byla CYSÁza použita *in vivo* u myších modelů s rakovinou prostaty, CYSÁza depletovala cystein pod detekovatelné množství, inhibovala proliferaci nádorových buněk a zároveň nebyly zaznamenány vedlejší účinky (Cramer et al., 2017).

Případy, kdy jsou nádorové buňky vyživovány buňkami nádorového mikroprostředí, nejsou nijak výjimečné, avšak zásadně snižují efektivitu terapie. Při inkubaci buněk stromatu a buněk chronické lymfocytární leukemie (CLL) s nízkou expresí transportéru xCT v médiu, ve kterém byl jako zdroj cysteinu obsažen CSSC, byla prokázána intercelulární metabolická interakce, která CLL buňkám pomohla nepříznivé podmínky přežít. Buňky CLL tak nepodlehly ničivým účinkům ROS z nedostatku tvorby GSH (Zhang et al., 2012). Stromální buňky kostní dřeně totiž přijímaly velké množství CSSC díky vysoké expresi transportéru xCT a syntetizovaný cystein exportovaly do extracelulárního prostředí kostní dřeně, ze kterého jej přijímaly buňky CLL (Zhang et al., 2012). V reakci na pozorování této interakce byla CYSÁza aplikována na kokulturu CLL buněk se stromálními buňkami kostní dřeně s výborným výsledkem (Cramer et al., 2017). Na základě těchto poznatků se nyní klade mnohem větší důraz na složení kultivačního média a na kokultivaci nádorových buněk ve snaze dosáhnout podmínek co nejbližších mikroprostředí nádoru, a tím co nejrelevantnějších výsledků výzkumů (Cantor et al., 2017). V souladu s těmito výzkumy je studie, ve které byly buňky rakoviny prsu se zvýšenou expresí antiportéru xCT v myších PDOX modelech úspěšně zlikvidovány při podání CYSÁzy (Cramer et al., 2017). Míra exprese antiportéru xCT tedy může sloužit jako dobrý ukazatel vhodnosti nasazení cyst(e)inázové terapie.

6.2.1.1 Limity cyteinázové terapie

Bylo zjištěno, že CYSÁza v porovnání s buthioninsulfoximinem (BSO), léčivem taktéž zasahujícím dráhu syntézy GSH, vykazovala mnohem vyšší cytotoxicitu, a proto je doporučováno CYSÁzu používat společně s BSO, jelikož spolu působí mnohem efektivněji (Cramer et al., 2017). Vzhledem k tomu, že je CYSÁza poměrně novým farmakem a zatím neprošla větším množstvím testů, nejsou známy její limity včetně vedlejších účinků.

7 Závěr

Cílem vývoje jakéhokoliv léčiva je schválení jeho používání v klinické praxi. Z enzymů využívajících aminokyselinovou auxotrofii nádorových buněk se to zatím podařilo jen ASNáze. Ta po dlouhá léta zůstává na výsluní sama, avšak v blízké budoucnosti by se tato situace s ohledem na pozorované výsledky mohla změnit. Velký příslib do budoucna představují vlastnosti ADI, o které je uvažováno, že by se mohla ASNáze přinejmenším vyrovnat. ADI v klinické fázi testování úspěšně ovlivnila buňky hepatocelulárního karcinomu, na rozdíl od ASNázy depletuje výhradně jednu aminokyselinu, arginin, a má antiangiogenní účinky. ASNáza i ADI jsou získané z bakteriálních zdrojů, a tak se potýkají s poměrně vysokou imunogenicitou, a tím pádem i s krátkým poločasem rozpadu. Terapie pomocí ARG by takové problémy mít nemusela, jelikož se jedná o enzym lidského původu. Je to ale čistě hypotetická úvaha, jelikož ARG se potýká s nedostatečnou enzymatickou aktivitou a zatím nebyla použita v klinickém testování, tudíž ji není možné plnohodnotně porovnat s ADI, která měla nadějně výsledky ve III. fázi klinického testování, natož ji porovnávat s běžně využívanou ASNázou. Také METáza zatím neprošla klinickým testováním, ačkoli od prvních výzkumů uběhla již řada let. V posledních letech však došlo k projevení opětovného zájmu o zkoumání jejích schopností omezovat proliferaci nádorových buněk, a tak možná nebudeme muset na další výsledky dlouho čekat. Za pozornost stojí i čerstvá novinka na poli depletačních enzymů – cyst(e)ináza, již ale čeká ještě dlouhá cesta, na které bude muset ukázat svůj terapeutický potenciál a případně obstát v dalších testováních.

Výzvou stávajících a budoucích výzkumů je eliminace vedlejších účinků a zmírnění imunitní reakce, kvůli které je zkracován poločas rozpadu. K částečné redukci těchto problémů došlo připojením PEG na enzymy. Ve hře je nyní ambiciózní projekt enkapsulace enzymů do erytrocytů. Takto upravený enzym je schován před imunitním systémem, díky čemuž razantně poklesla toxicita a prodloužila se cirkulace enzymu v těle. Další výzvou je zamezení kooperace nádorových buněk s buňkami nádorového mikroprostředí, kvůli které se nádorové buňky mohou stát rezistentní vůči podávanému enzymu a posléze může dojít až k relapsu onemocnění. Proto se nepředpokládá, že budou tyto enzymy podávány samostatně. Více pravděpodobné je jejich využití v kombinaci se zavedenou protinádorovou léčbou, čímž by mohlo být dosaženo snížení koncentrace dosud podávaných cytostatických léků. Vzhledem k jejich nespecifickému účinku jak na nádorové, tak na normální buňky dojde k poklesu toxicity a nežádoucích účinků, které jsou limitující pro zlepšování účinku současné terapie.

8 Seznam literatury

- Abou-Alfa, G.K., Qin, S., Ryoo, B.Y., Lu, S.N., Yen, C.J., Feng, Y.H., Lim, H.Y., Izzo, F., Colombo, M., Sarker, D., et al. (2018). Phase III randomized study of second line ADI-PEG 20 plus best supportive care versus placebo plus best supportive care in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Ann. Oncol.* 29, 1402–1408.
- Aghaiypour, K., Wlodawer, A., and Lubkowski, J. (2001). Structural basis for the activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. *Biochemistry* 40, 5655–5664.
- Agrawal, V., Woo, J.H., Mauldin, J.P., Jo, C., Stone, E.M., Georgiou, G., and Frankel, A.E. (2012). Cytotoxicity of human recombinant arginase i (Co)-PEG5000 in the presence of supplemental L-citrulline is dependent on decreased argininosuccinate synthetase expression in human cells. *Anticancer. Drugs* 23, 51–64.
- Armstrong, J.K., Hempel, G., Kolling, S., Chan, L.S., Fisher, T., Meiselman, H.J., and Garratty, G. (2007). Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients. *Cancer* 110, 103–111.
- Avramis, V.I., Sencer, S., Periclou, A.P., Sather, H., Bostrom, B.C., Cohen, L.J., Ettinger, A.G., Ettinger, L.J., Franklin, J., Gaynon, P.S., et al. (2002). A randomized comparison of native *Escherichia coli* asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: A Children’s Cancer Group study. *Blood* 99, 1986–1994.
- Bachet, J.B., Gay, F., Maréchal, R., Galais, M.P., Adenis, A., Salako, D., Cros, J., Demetter, P., Svrcek, M., Bardier-Dupas, A., et al. (2015). Asparagine synthetase expression and phase i study with l-asparaginase encapsulated in red blood cells in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 44, 1141–1147.
- Belalcázar, A.D., Ball, J.G., Frost, L.M., Valentovic, M.A., and Wilkinson, J. 4th (2014). Transsulfuration Is a Significant Source of Sulfur for Glutathione Production in Human Mammary Epithelial Cells. *ISRN Biochem.* 2013, 637897.
- Beloussow, K., Wang, L., Wu, J., Ann, D., and Shen, W.C. (2002). Recombinant arginine deiminase as a potential anti-angiogenic agent. *Cancer Lett.* 183, 155–162.
- Billett, A.L., Sallan, S.E., Carls, A., and Gelber, R.D. (1992). Allergic reactions to *Erwinia* asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia who had previous allergic reactions to *escherichia coli* asparaginase. *Cancer* 70, 201–206.
- Bolzoni, M., Chiu, M., Accardi, F., Vescovini, R., Airoidi, I., Storti, P., Todoerti, K., Agnelli, L., Missale, G., Andreoli, R., et al. (2016). Dependence on glutamine uptake and glutamine addiction characterize myeloma cells: A new attractive target. *Blood* 128, 667–679.
- Booher, K., Lin, D.W., Borrego, S.L., and Kaiser, P. (2012). Downregulation of Cdc6 and pre-replication complexes in response to methionine stress in breast cancer cells. *Cell Cycle* 11, 4414–4423.
- Borrego, S.L., Fahrman, J., Datta, R., Stringari, C., Grapov, D., Zeller, M., Chen, Y., Wang,

- P., Baldi, P., Gratton, E., et al. (2016). Metabolic changes associated with methionine stress sensitivity in MDA-MB-468 breast cancer cells. *Cancer Metab.* 4, 1–17.
- Caldwell, R.W., Rodriguez, P.C., Toque, H.A., Priya Narayanan, S., and Caldwell, R.B. (2018). Arginase: A multifaceted enzyme important in health and disease. *Physiol. Rev.* 98, 641–665.
- Campbell, H.A., Mashburn, L.T., Boyse, E.A., and Old, L.J. (1967). Two L-Asparaginases from *Escherichia coli* B. Their Separation, Purification, and Antitumor Activity*. *Biochemistry* 6, 721–730.
- Cantor, J.R., Abu-Remaileh, M., Kanarek, N., Freinkman, E., Gao, X., Louissaint, A., Lewis, C.A., and Sabatini, D.M. (2017). Physiologic Medium Rewires Cellular Metabolism and Reveals Uric Acid as an Endogenous Inhibitor of UMP Synthase. *Cell* 169, 258–272.e17.
- Capizzi, R.L., Bertino, J.R., and Handschumacher, R.E. (1970). L-asparaginase. *Annu. Rev. Med.* 21, 433–444.
- Carson, D.A., Nobori, T., Kajander, E.O., Carrera, C.J., Kubota, M., and Yamanaka, H. (1988). Methylthioadenosine (MeSAAdo) phosphorylase deficiency in malignancy. *Adv. Exp. Med. Biol.* 250, 179–185.
- Cha, Y.H., Yook, J.I., Kim, H.S., and Kim, N.H. (2015). Catabolic metabolism during cancer EMT. *Arch. Pharm. Res.* 38, 313–320.
- Chan, W.K., Lorenzi, P.L., Anishkin, A., Purwaha, P., Rogers, D.M., Sukharev, S., Rempe, S.B., and Weinstein, J.N. (2014). The glutaminase activity of L-asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells. *Blood* 123, 3596–3606.
- Chello, P.L., and Bertino, J.R. (1973). Dependence of 5-methyltetrahydrofolate utilization by L5178Y murine leukemia cells in vitro on the presence of hydroxycobalamin and transcobalamin II. *Cancer Res.* 33, 1898–1904.
- Chiu, M., Taurino, G., Bianchi, M.G., Ottaviani, L., Andreoli, R., Ciociola, T., Lagrasta, C.A.M., Tardito, S., and Bussolati, O. (2018). Oligodendroglioma cells lack glutamine synthetase and are auxotrophic for glutamine, but do not depend on glutamine anaplerosis for growth. *Int. J. Mol. Sci.* 19.
- Cramer, S.L., Saha, A., Liu, J., Tadi, S., Tiziani, S., Yan, W., Triplett, K., Lamb, C., Alters, S.E., Rowlinson, S., et al. (2017). Systemic depletion of L-cyst(e)ine with cyst(e)inase increases reactive oxygen species and suppresses tumor growth. *Nat. Med.* 23, 120–127.
- Crenn, P., Messing, B., and Cynober, L. (2008). Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction. *Clin. Nutr.* 27, 328–339.
- Darvishi, F., Faraji, N., and Shamsi, F. (2019). Production and structural modeling of a novel asparaginase in *Yarrowia lipolytica*. *Int. J. Biol. Macromol.* 125, 955–961.
- Das, K., Butler, G.H., Kwiatkowski, V., Clark, A.D., Yadav, P., and Arnold, E. (2004). Crystal structures of arginine deiminase with covalent reaction intermediates: Implications for catalytic mechanism. *Structure* 12, 657–667.
- Dillon, B.J., Prieto, V.G., Curley, S.A., Ensor, C.M., Holtsberg, F.W., Bomalaski, J.S., and Clark, M.A. (2004). Incidence and Distribution of Argininosuccinate Synthetase

- Deficiency in Human Cancers: A Method for Identifying Cancers Sensitive to Arginine Deprivation. *Cancer* *100*, 826–833.
- Ding, Y., Li, Z., and Broome, J.D. (2005). Epigenetic changes in the repression and induction of asparagine synthetase in human leukemic cell lines. *Leukemia* *19*, 420–426.
- Dixon, S.J., and Stockwell, B.R. (2014). The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nat. Chem. Biol.* *10*, 9–17.
- Douer, D., Yampolsky, H., Cohen, L.J., Watkins, K., Levine, A.M., Periclou, A.P., and Avramis, V.I. (2007). Pharmacodynamics and safety of intravenous pegaspargase during remission induction in adults aged 55 years or younger with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *Blood* *109*, 2744–2750.
- Doxsee, D.W., Gout, P.W., Kurita, T., Lo, M., Buckley, A.R., Wang, Y., Xue, H., Karp, C.M., Cutz, J.-C., Cunha, G.R., et al. (2007). Sulfasalazine-induced cystine starvation: potential use for prostate cancer therapy. *Prostate* *67*, 162–171.
- Duval, M., Suci, S., Ferster, A., Riolland, X., Nelken, B., Lutz, P., Benoit, Y., Robert, A., Manel, A.M., Vilmer, E., et al. (2002). Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia-asparaginase* in the treatment of childhood lymphoid malignancies: Results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer - Children's Leukemia Group phase 3 trial. *Blood* *99*, 2734–2739.
- Dzik, J.M. (2014). Evolutionary roots of arginase expression and regulation. *Front. Immunol.* *5*, 1–12.
- Eagle, H. (1955). Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* (80-). *122*, 501–504.
- Ehsanipour, E.A., Sheng, X., Behan, J.W., Wang, X., Butturini, A., Avramis, V.I., and Mittelman, S.D. (2013). Adipocytes cause leukemia cell resistance to L-asparaginase via release of glutamine. *Cancer Res.* *73*, 2998–3006.
- El-Naggar, N.E.A., Deraz, S.F., Soliman, H.M., El-Deeb, N.M., and El-Ewasy, S.M. (2016). Purification, characterization, cytotoxicity and anticancer activities of L-asparaginase, anti-colon cancer protein, from the newly isolated alkaliphilic *Streptomyces fradiae* NEAE-82. *Sci. Rep.* *6*.
- Ensor, C.M., Holtsberg, F.W., Bomalaski, J.S., and Clark, M.A. (2002). Pegylated arginine deiminase (ADI-SS PEG20,000 mw) inhibits human melanomas and hepatocellular carcinomas in vitro and in vivo. *Cancer Res.* *62*, 5443–5450.
- Epner, D.E., Morrow, S., Wilcox, M., and Houghton, J.L. (2002). Nutrient intake and nutritional indexes in adults with metastatic cancer on a phase I clinical trial of dietary methionine restriction. *Nutr. Cancer* *42*, 158–166.
- Furusawa, A., Miyamoto, M., Takano, M., Tsuda, H., Song, Y.S., Aoki, D., Miyasaka, N., Inazawa, J., and Inoue, J. (2018). Ovarian cancer therapeutic potential of glutamine depletion based on GS expression. *Carcinogenesis* *39*, 758–766.
- Gay, F., Aguera, K., Senechal, K., Bes, J., Chevrier, A.-M., Gallix, F., Guicher, C., Lorenzi, P., Bourgeaux, V., Berlier, W., et al. (2016). Abstract 4812: Arginine deiminase loaded in erythrocytes: a promising formulation for L-arginine deprivation therapy in cancers. In

- Cancer Research, (American Association for Cancer Research (AACR)), pp. 4812–4812.
- Gay, F., Aguera, K., Sénéchal, K., Tainturier, A., Berlier, W., Maucort-Boulch, D., Honnorat, J., Horand, F., Godfrin, Y., and Bourgeaux, V. (2017). Methionine tumor starvation by erythrocyte-encapsulated methionine gamma-lyase activity controlled with per os vitamin B6. *Cancer Med.* *6*, 1437–1452.
- Gong, H., Zölzer, F., Von Recklinghausen, G., Havers, W., and Schweigerer, L. (2000). Arginine deiminase inhibits proliferation of human leukemia cells more potently than asparaginase by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Leukemia* *14*, 826–829.
- Gupta, S., Sahu, D., Bomalaski, J.S., Frank, I., Boorjian, S.A., Thapa, P., Cheville, J.C., and Hansel, D.E. (2018). Argininosuccinate Synthetase-1 (ASS1) Loss in High-Grade Neuroendocrine Carcinomas of the Urinary Bladder: Implications for Targeted Therapy with ADI-PEG 20. *Endocr. Pathol.* *29*, 236–241.
- Halfon-Domenech, C., Thomas, X., Chabaud, S., Baruchel, A., Gueyffier, F., Mazingue, F., Auvrignon, A., Corm, S., Dombret, H., Chevallier, P., et al. (2011). L-asparaginase loaded red blood cells in refractory or relapsing acute lymphoblastic leukaemia in children and adults: Results of the GRASPALL 2005-01 randomized trial. *Br. J. Haematol.* *153*, 58–65.
- Halpern, B.C., Clark, B.R., Hardy, D.N., Halpern, R.M., and Smith, R.A. (1974). The effect of replacement of methionine by homocystine on survival of malignant and normal adult mammalian cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *71*, 1133–1136.
- Hammel, P., Fabienne, P., Mineur, L., Metges, J.P., Andre, T., De La Fouchardiere, C., Louvet, C., El Hajbi, F., Faroux, R., Guimbaud, R., et al. (2020). Erythrocyte-encapsulated asparaginase (eryaspase) combined with chemotherapy in second-line treatment of advanced pancreatic cancer: An open-label, randomized Phase IIb trial. *Eur. J. Cancer* *124*, 91–101.
- Han, Q., Hoffman, R.M., and Diego, S. (2021). Lowering and Stabilizing PSA Levels in Advanced-prostate Cancer Patients With Oral Methioninase. *1926*, 1921–1926.
- Harris, I.S., Treloar, A.E., Inoue, S., Sasaki, M., Gorrini, C., Lee, K.C., Yung, K.Y., Brenner, D., Knobbe-Thomsen, C.B., Cox, M.A., et al. (2015). Glutathione and Thioredoxin Antioxidant Pathways Synergize to Drive Cancer Initiation and Progression. *Cancer Cell* *27*, 211–222.
- Haskell, C.M., Canellos, G.P., Leventhal, B.G., Carbone, P.P., Block, J.B., Serpick, A.A., and Selawry, O.S. (1969). L-asparaginase: therapeutic and toxic effects in patients with neoplastic disease. *N. Engl. J. Med.* *281*, 1028–1034.
- Hays, J.L., Kim, G., Walker, A., Annuziata, C.M., Lee, J.-M., Squires, J., Houston, N., Steinberg, S.M., and Kohn, E.C. (2013). A phase II clinical trial of polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase in patients with advanced ovarian cancer: Early closure for safety. *Mol. Clin. Oncol.* *1*, 565–569.
- Hermanova, I., Arruabarrena-Aristorena, A., Valis, K., Nuskova, H., Alberich-Jorda, M., Fiser, K., Fernandez-Ruiz, S., Kavan, D., Pecinova, A., Niso-Santano, M., et al. (2016). Pharmacological inhibition of fatty-acid oxidation synergistically enhances the effect of L-asparaginase in childhood ALL cells. *Leukemia* *30*, 209–218.

- Higuchi, T., Kawaguchi, K., Miyake, K., Han, Q., Tan, Y., Oshiro, H., Sugisawa, N., Zhang, Z., Razmjooei, S., Yamamoto, N., et al. (2018). Oral Recombinant Methioninase Combined with Caffeine and Doxorubicin Induced Regression of a Doxorubicin-resistant Synovial Sarcoma in a PDOX Mouse Model. *Anticancer Res.* *38*, 5639–5644.
- Hoffman, R.M., and Erbe, R.W. (1976). High in vivo rates of methionine biosynthesis in transformed human and malignant rat cells auxotrophic for methionine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *73*, 1523–1527.
- Hoffman, R.M., and Jacobsen, S.J. (1980). Reversible growth arrest in simian virus 40-transformed human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *77*, 7306–7310.
- Hoffman, R.M., Tan, Y., Li, S., Han, Q., Zavala, J., and Zavala, J. (2019). Pilot phase I clinical trial of methioninase on high-stage cancer patients: Rapid depletion of circulating methionine. *Methods Mol. Biol.* *1866*, 231–242.
- Holtsberg, F.W., Ensor, C.M., Steiner, M.R., Bomalaski, J.S., and Clark, M.A. (2002). Poly(ethylene glycol) (PEG) conjugated arginine deiminase: Effects of PEG formulations on its pharmacological properties. *J. Control. Release* *80*, 259–271.
- Huang, H.Y., Wu, W.R., Wang, Y.H., Wang, J.W., Fang, F.M., Tsai, J.W., Li, S.H., Hung, H.C., Yu, S.C., Lan, J., et al. (2013). ASS1 as a novel tumor suppressor gene in myxofibrosarcomas: Aberrant loss via epigenetic DNA methylation confers aggressive phenotypes, negative prognostic impact, and therapeutic relevance. *Clin. Cancer Res.* *19*, 2861–2872.
- Huang, L., Liu, Y., Sun, Y., Yan, Q., and Jiang, Z. (2014). Biochemical characterization of a novel L-asparaginase with low glutaminase activity from *Rhizomucor miehei* and its application in food safety and leukemia treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* *80*, 1561–1569.
- Hunault-Berger, M., Leguay, T., Huguet, F., Leprêtre, S., Deconinck, E., Ojeda-Urbe, M., Bonmati, C., Escoffre-Barbe, M., Bories, P., Himmerlin, C., et al. (2015). A Phase 2 study of L-asparaginase encapsulated in erythrocytes in elderly patients with Philadelphia chromosome negative acute lymphoblastic leukemia: The GRASPALL/GRAALL-SA2-2008 study. *Am. J. Hematol.* *90*, 811–818.
- Igarashi, K., Kawaguchi, K., Kiyuna, T., Miyake, K., Murakami, T., Yamamoto, N., Hayashi, K., Kimura, H., Miwa, S., Tsuchiya, H., et al. (2017). Effective metabolic targeting of human osteosarcoma cells in vitro and in orthotopic nude-mouse models with recombinant methioninase. *Anticancer Res.* *37*, 4807–4812.
- Igarashi, K., Kawaguchi, K., Kiyuna, T., Miyake, K., Miyaki, M., Yamamoto, N., Hayashi, K., Kimura, H., Miwa, S., Higuchi, T., et al. (2018a). Metabolic targeting with recombinant methioninase combined with palbociclib regresses a doxorubicin-resistant dedifferentiated liposarcoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *506*, 912–917.
- Igarashi, K., Kawaguchi, K., Li, S., Han, Q., Tan, Y., Murakami, T., Kiyuna, T., Miyake, K., Miyake, M., Singh, A.S., et al. (2018b). Recombinant methioninase in combination with doxorubicin (DOX) overcomes first-line DOX resistance in a patient-derived orthotopic xenograft nude-mouse model of undifferentiated spindle-cell sarcoma. *Cancer Lett.* *417*, 168–173.

- Igarashi, K., Kawaguchi, K., Kiyuna, T., Miyake, K., Miyake, M., Li, S., Han, Q., Tan, Y., Zhao, M., Li, Y., et al. (2018c). Tumor-targeting *Salmonella typhimurium* A1-R combined with recombinant methioninase and cisplatin eradicates an osteosarcoma cisplatin-resistant lung metastasis in a patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) mouse model: decoy, trap and kill chemoth. *Cell Cycle* 17, 801–809.
- Igarashi, K., Kawaguchi, K., Li, S., Han, Q., Tan, Y., Gainor, E., Kiyuna, T., Miyake, K., Miyake, M., Higuchi, T., et al. (2018d). Recombinant methioninase combined with doxorubicin (DOX) regresses a DOX-resistant synovial sarcoma in a patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) mouse model. *Oncotarget* 9, 19263–19272.
- Iwamoto, S., Mihara, K., Downing, J.R., Pui, C.H., and Campana, D. (2007). Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *J. Clin. Invest.* 117, 1049–1057.
- Izzo, F., Marra, P., Beneduce, G., Castello, G., Vallone, P., De Rosa, V., Cremona, F., Ensor, C.M., Holtsberg, F.W., Bomalaski, J.S., et al. (2004). Pegylated arginine deiminase treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: Results from phase I/II studies. *J. Clin. Oncol.* 22, 1815–1822.
- Jenkinson, C.P., Grody, W.W., and Cederbaum, S.D. (1996). Comparative properties of arginases. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 114, 107–132.
- Kawaguchi, K., Igarashi, K., Li, S., Han, Q., Tan, Y., Kiyuna, T., Miyake, K., Murakami, T., Chmielowski, B., Nelson, S.D., et al. (2017). Combination treatment with recombinant methioninase enables temozolomide to arrest a BRAF V600E melanoma in a patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) mouse model. *Oncotarget* 8, 85516–85525.
- Kawaguchi, K., Higuchi, T., Li, S., Han, Q., Tan, Y., Igarashi, K., Zhao, M., Miyake, K., Kiyuna, T., Miyake, M., et al. (2018a). Combination therapy of tumor-targeting *Salmonella typhimurium* A1-R and oral recombinant methioninase regresses a BRAF-V600E-negative melanoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 503, 3086–3092.
- Kawaguchi, K., Igarashi, K., Li, S., Han, Q., Tan, Y., Miyake, K., Kiyuna, T., Miyake, M., Murakami, T., Chmielowski, B., et al. (2018b). Recombinant methioninase (rMETase) is an effective therapeutic for BRAF-V600E-negative as well as-positive melanoma in patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) mouse models.
- Kawaguchi, K., Han, Q., Li, S., Tan, Y., Igarashi, K., Kiyuna, T., Miyake, K., Miyake, M., Chmielowski, B., Nelson, S.D., et al. (2018c). Targeting methionine with oral recombinant methioninase (o-rMETase) arrests a patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) model of BRAF-V600E mutant melanoma: implications for chronic clinical cancer therapy and prevention. *Cell Cycle* 17, 356–361.
- Kawaguchi, K., Miyake, K., Han, Q., Li, S., Tan, Y., Igarashi, K., Lwin, T.M., Higuchi, T., Kiyuna, T., Miyake, M., et al. (2018d). Targeting altered cancer methionine metabolism with recombinant methioninase (rMETase) overcomes partial gemcitabine-resistance and regresses a patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) nude mouse model of pancreatic cancer. *Cell Cycle* 17, 868–873.
- Kawaguchi, K., Miyake, K., Han, Q., Li, S., Tan, Y., Igarashi, K., Kiyuna, T., Miyake, M., Higuchi, T., Oshiro, H., et al. (2018e). Oral recombinant methioninase (o-rMETase) is superior to injectable rMETase and overcomes acquired gemcitabine resistance in

- pancreatic cancer. *Cancer Lett.* 432, 251–259.
- Kepka-Lenhardt, D., Mistry, S.K., Wu, G., and Morris, S.M. (2000). Arginase I: A limiting factor for nitric oxide and polyamine synthesis by activated macrophages? *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279, 2237–2242.
- Kim, J., Hong, S.J., Park, J.H., Park, S.Y., Kim, S.W., Cho, E.Y., Do, I.-G., Joh, J.-W., and Kim, D.S. (2009). Expression of cystathionine beta-synthase is downregulated in hepatocellular carcinoma and associated with poor prognosis. *Oncol. Rep.* 21, 1449–1454.
- Krall, A.S., Xu, S., Graeber, T.G., Braas, D., and Christofk, H.R. (2016). Asparagine promotes cancer cell proliferation through use as an amino acid exchange factor. *Nat. Commun.* 7.
- Kravtsoff, R., Desbois, I., Lamagnere, J.P., Muh, J.P., Valat, C., Chassaigne, M., Colombat, P., and Ropars, C. (1996). Improved pharmacodynamics of L-asparaginase-loaded in human red blood cells. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 49, 465–470.
- Kwong-Lam, F., and Chi-Fung, C.G. (2013). Vincristine could partly suppress stromal support to T-ALL blasts during pegylated arginase I treatment. *Exp. Hematol. Oncol.* 2.
- Lamb, J., and Wheatley, D.N. (2000). Single amino acid (arginine) deprivation induces G1 arrest associated with inhibition of Cdk4 expression in cultured human diploid fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 255, 238–249.
- Larsen, T.M., Boehlein, S.K., Schuster, S.M., Richards, N.G.J., Thoden, J.B., Holden, H.M., and Rayment, I. (1999). Three-dimensional structure of Escherichia coli asparagine synthetase B: A short journey from substrate to product. *Biochemistry* 38, 16146–16157.
- Leslie, M., Case, M.C., Hall, A.G., and Coulthard, S.A. (2006). Expression levels of asparagine synthetase in blasts from children and adults with acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 132, 740–742.
- Lin, C., Wang, Z., Li, L., He, Y., Fan, J., Liu, Z., Zhao, S., and Ju, D. (2015). The role of autophagy in the cytotoxicity induced by recombinant human arginase in laryngeal squamous cell carcinoma. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 8487–8494.
- Lin, D.W., Chung, B.P., and Kaiser, P. (2014). S-adenosylmethionine limitation induces p38 mitogen-activated protein kinase and triggers cell cycle arrest in G1. *J. Cell Sci.* 127, 50–59.
- Lind, D.S. (2004). Arginine and cancer. *J. Nutr.* 134, 2837–2841.
- Liu, C., Luo, L., and Lin, Q. (2019). Antitumor activity and ability to prevent acrylamide formation in fried foods of asparaginase from soybean root nodules. *J. Food Biochem.* 43.
- Lubkowski, J., Dauter, M., Aghaiypour, K., Wlodawer, A., and Dauter, Z. (2003). Atomic resolution structure of Erwinia chrysanthemii L-asparaginase. *Acta Crystallogr. Sect. D* 59, 84–92.
- Maisonneuve, P. (2019). Epidemiology and burden of pancreatic cancer. *Press. Medicale* 48, e113–e123.

- Mauldin, J.P., Zeinali, I., Kleypas, K., Woo, J.H., Blackwood, R.S., Jo, C.H., Stone, E.M., Georgiou, G., and Frankel, A.E. (2012). Recombinant human arginase Toxicity in mice is reduced by citrulline supplementation. *Transl. Oncol.* 5, 26–31.
- Mecham, J.O., Rowitch, D., Wallace, C.D., Stern, P.H., and Hoffman, R.M. (1983). The metabolic defect of methionine dependence occurs frequently in human tumor cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117, 429–434.
- Miraki-Moud, F., Ghazaly, E., Ariza-McNaughton, L., Hodby, K.A., Clear, A., Anjos-Afonso, F., Liapis, K., Grantham, M., Sohrabi, F., Cavenagh, J., et al. (2015). Arginine deprivation using pegylated arginine deiminase has activity against primary acute myeloid leukemia cells in vivo. *Blood* 125, 4060–4068.
- Moe-Byrne, T., Wagner, J.V., and McGuire, W. (2012). Glutamine supplementation to prevent morbidity and mortality in preterm infants. In *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (John Wiley & Sons, Ltd), p.
- Mohan Kumar, N.S., and Manonmani, H.K. (2013). Purification, characterization and kinetic properties of extracellular L-asparaginase produced by *Cladosporium* sp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 577–587.
- Morris, S.M. (2007). Arginine metabolism: Boundaries of our knowledge. *J. Nutr.* 137.
- Morris, S.M., Bhamidipati, D., and Kepka-Lenhart, D. (1997). Human type II arginase: Sequence analysis and tissue-specific expression. *Gene* 193, 157–161.
- Müller, H.J., and Boos, J. (1998). Use of L-asparaginase in childhood ALL. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 28, 97–113.
- Murakami, T., Li, S., Han, Q., Tan, Y., Kiyuna, T., Igarashi, K., Kawaguchi, K., Kyoung Hwang, H., Miyake, K., Singh, A.S., et al. (2017). Oncotarget 35630 www.impactjournals.com/oncotarget Recombinant methioninase effectively targets a Ewing’s sarcoma in a patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) nude-mouse model.
- Nguyen, H.A., Su, Y., and Lavie, A. (2016). Design and characterization of *erwinia chrysanthemi* L-asparaginase variants with diminished L-glutaminase activity. *J. Biol. Chem.* 291, 17664–17676.
- Nicholson, L.J., Smith, P.R., Hiller, L., Szlosarek, P.W., Kimberley, C., Sehouli, J., Koensgen, D., Mustea, A., Schmid, P., and Crook, T. (2009). Epigenetic silencing of argininosuccinate synthetase confers resistance to platinum-induced cell death but collateral sensitivity to arginine auxotrophy in ovarian cancer. *Int. J. Cancer* 125, 1454–1463.
- Nowak-Göttl, U., Heinecke, A., Von Kries, R., Nürnberger, W., Münchow, N., and Junker, R. (2001). Thrombotic events revisited in children with acute lymphoblastic leukemia - Impact of concomitant *Escherichia coli* asparaginase/prednisone administration. *Thromb. Res.* 103, 165–172.
- Oettgen, H.F., Stephenson, P.A., Schwartz, M.K., Leeper, R.D., Tallal, L., Tan, C.C., Clarkson, B.D., Golbey, R.B., Krakoff, I.H., Karnofsky, D.A., et al. (1970). Toxicity of *E. coli* L-asparaginase in man. *Cancer* 25, 253–278.
- Offman, M.N., Krol, M., Patel, N., Krishnan, S., Liu, J.Z., Saha, V., and Bates, P.A. (2011).

- Rational engineering of L-asparaginase reveals importance of dual activity for cancer cell toxicity. *Blood* *117*, 1614–1621.
- Orentreich, N., Matias, J.R., DeFelice, A., and Zimmerman, J.A. (1993). Low methionine ingestion by rats extends life span. *J. Nutr.* *123*, 269–274.
- Panosyan, E.H., Grigoryan, R.S., Avramis, I.A., Seibel, N.L., Gaynon, P.S., Siegel, S.E., Fingert, H.J., and Avramis, V.I. (2004). Deamination of glutamine is a prerequisite for optimal asparagine deamination by asparaginases in vivo (CCG-1961). *Anticancer Res.* *24*, 1121–1125.
- Park, I.S., Kang, S.W., Shin, Y.J., Chae, K.Y., Park, M.O., Kim, M.Y., Wheatley, D.N., and Min, B.H. (2003). Arginine deiminase: A potential inhibitor of angiogenesis and tumour growth. *Br. J. Cancer* *89*, 907–914.
- Parkhitko, A.A., Jouandin, P., Mohr, S.E., and Perrimon, N. (2019). Methionine metabolism and methyltransferases in the regulation of aging and lifespan extension across species. *Aging Cell* *18*, 1–18.
- Parmentier, J.H., Maggi, M., Tarasco, E., Scotti, C., Avramis, V.I., and Mittelman, S.D. (2015). Glutaminase activity determines cytotoxicity of l-asparaginases on most leukemia cell lines. *Leuk. Res.* *39*, 757–762.
- Persa, C., Osmotherly, K., Chao-Wei Chen, K., Moon, S., and Lou, M.F. (2006). The distribution of cystathionine beta-synthase (CBS) in the eye: implication of the presence of a trans-sulfuration pathway for oxidative stress defense. *Exp. Eye Res.* *83*, 817–823.
- Pieters, R., Hunger, S.P., Boos, J., Rizzari, C., Silverman, L., Baruchel, A., Goekbuget, N., Schrappe, M., and Pui, C.H. (2011). L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* *117*, 238–249.
- Plourde, P. V., Jeha, S., Hijjiya, N., Keller, F.G., Silverman, L.B., Rheingold, S.R., Dreyer, Z.E., Dahl, G. V., Mercedes, T., Lai, C., et al. (2014). Safety profile of asparaginase *Erwinia chrysanthemi* in a large compassionate-use trial. *Pediatr. Blood Cancer* *61*, 1232–1238.
- Purwaha, P., Lorenzi, P.L., Silva, L.P., Hawke, D.H., and Weinstein, J.N. (2014). Targeted metabolomic analysis of amino acid response to L-asparaginase in adherent cells. *Metabolomics* *10*, 909–919.
- Ratnikov, B., Aza-Blanc, P., Ronai, Z.A., Smith, J.W., Osterman, A.L., and Scott, D.A. (2015). Glutamate and asparagine cataplerosis underlie glutamine addiction in melanoma. *Oncotarget* *6*, 7379–7389.
- Rau, R.E., Dreyer, Z.A., Choi, M.R., Liang, W., Skowronski, R., Allamneni, K.P., Devidas, M., Raetz, E.A., Adamson, P.C., Blaney, S.M., et al. (2018). Outcome of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia/lymphoblastic lymphoma with hypersensitivity to pegaspargase treated with PEGylated *Erwinia* asparaginase, pegcrisantaspase: A report from the Children’s Oncology Group. *Pediatr. Blood Cancer* *65*.
- Reinert, R.B., Oberle, L.M., Wek, S.A., Bunpo, P., Xue, P.W., Mileva, I., Goodwin, L.O., Aldrich, C.J., Durden, D.L., McNurlan, M.A., et al. (2006). Role of glutamine depletion in directing tissue-specific nutrient stress responses to L-asparaginase. *J. Biol. Chem.*

281, 31222–31233.

- Rigouin, C., Nguyen, H.A., Schalk, A.M., and Lavie, A. (2017). Discovery of human-like L-asparaginases with potential clinical use by directed evolution. *Sci. Rep.* 7.
- Samson, M.L. (2000). *Drosophila* arginase is produced from a nonvital gene that contains the elav locus within its third intron. *J. Biol. Chem.* 275, 31107–31114.
- Sanderson, S.M., Gao, X., Dai, Z., and Locasale, J.W. (2019). Methionine metabolism in health and cancer: a nexus of diet and precision medicine. *Nat. Rev. Cancer* 19, 625–637.
- Sands, S., Ladas, E.J., Kelly, K.M., Weiner, M., Lin, M., Ndao, D.H., Dave, A., Vahdat, L.T., and Bender, J.G. (2017). Glutamine for the treatment of vincristine-induced neuropathy in children and adolescents with cancer. *Support. Care Cancer* 25, 701–708.
- Schrey, D., Borghorst, S., Lanvers-Kaminsky, C., Hempel, G., Gerß, J., Möricke, A., Schrappe, M., and Boos, J. (2010). Therapeutic drug monitoring of asparaginase in the ALL-BFM 2000 protocol between 2000 and 2007. *Pediatr. Blood Cancer* 54, 952–958.
- Sénéchal, K., Maubant, S., Leblanc, M., Ciré, S., Gallix, F., Andrivon, A., Duchamp, O., Viviani, F., Horand, F., Scheer, A., et al. (2019). Abstract 2258: Erymethionase (methionine-gamma-lyase encapsulated into red blood cells) potentiates anti-PD-1 therapy in TNBC syngeneic mouse model. In *Cancer Research*, (American Association for Cancer Research (AACR)), pp. 2258–2258.
- Shiozaki, A., Iitaka, D., Ichikawa, D., Nakashima, S., Fujiwara, H., Okamoto, K., Kubota, T., Komatsu, S., Kosuga, T., Takeshita, H., et al. (2014). xCT, component of cysteine/glutamate transporter, as an independent prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma. *J. Gastroenterol.* 49, 853–863.
- Shiraki, N., Shiraki, Y., Tsuyama, T., Obata, F., Miura, M., Nagae, G., Aburatani, H., Kume, K., Endo, F., and Kume, S. (2014). Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Metab.* 19, 780–794.
- van der Sluis, I.M., Vrooman, L.M., Pieters, R., Baruchel, A., Escherich, G., Goulden, N., Mondelaers, V., de Toledo, J.S., Rizzari, C., Silverman, L.B., et al. (2016). Consensus expert recommendations for identification and management of asparaginase hypersensitivity and silent inactivation. *Haematologica* 101, 279–285.
- Stern, P.H., Wallace, C.D., and Hoffman, R.M. (1984). Altered methionine metabolism occurs in all members of a set of diverse human tumor cell lines. *J. Cell. Physiol.* 119, 29–34.
- Stock, W., Douer, D., Deangelo, D.J., Arellano, M., Advani, A., Damon, L., Kovacsovics, T., Litzow, M., Rytting, M., Borthakur, G., et al. (2011). Prevention and management of asparaginase/pegasparaginase-associated toxicities in adults and older adolescents: Recommendations of an expert panel. *Leuk. Lymphoma* 52, 2237–2253.
- Stone, E.M., Chantranupong, L., and Georgiou, G. (2010a). The second-shell metal ligands of human arginase affect coordination of the nucleophile and substrate. *Biochemistry* 49, 10582–10588.
- Stone, E.M., Glazer, V.S., Chantranupong, L., Cherukuri, P., Breece, R.M., Tierney, D.L., Curley, S.A., Iverson, B.L., and Georgiou, G. (2010b). Replacing Mn²⁺ with Co²⁺ in

- Human Arginase i Enhances Cytotoxicity toward L-Arginine Auxotrophic Cancer Cell Lines. *ACS Chem. Biol.* *5*, 333–342.
- Story, M.D., Voehringer, D.W., Stephens, L.C., and Meyn, R.E. (1993). L-asparaginase kills lymphoma cells by apoptosis. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *32*, 129–133.
- Sudhir, A.P., Agarwaal, V. V., Dave, B.R., Patel, D.H., and Subramanian, R.B. (2016). Enhanced catalysis of l-asparaginase from *Bacillus licheniformis* by a rational redesign. *Enzyme Microb. Technol.* *86*, 1–6.
- Sugimura, T., Birnbaum, S.M., Winitz, M., and Greenstein, J.P. (1959). Quantitative nutritional studies with water-soluble, chemically defined diets. VIII. The forced feeding of diets each lacking in one essential amino acid. *Arch. Biochem. Biophys.* *81*, 448–455.
- Sugisawa, N., Higuchi, T., Han, Q., Hozumi, C., Yamamoto, J., Tashiro, Y., Nishino, H., Kawaguchi, K., Bouvet, M., Murata, T., et al. (2021). Oral recombinant methioninase combined with paclitaxel arrests recalcitrant ovarian clear cell carcinoma growth in a patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) nude-mouse model. *Cancer Chemother. Pharmacol.*
- Syed, N., Langer, J., Janczar, K., Singh, P., Lo Nigro, C., Lattanzio, L., Coley, H.M., Hatzimichael, E., Bomalaski, J., Szlosarek, P., et al. (2013). Epigenetic status of argininosuccinate synthetase and argininosuccinate lyase modulates autophagy and cell death in glioblastoma. *Cell Death Dis.* *4*, 1–11.
- Szlosarek, P.W., Klabatsa, A., Pallaska, A., Sheaff, M., Smith, P., Crook, T., Grimshaw, M.J., Steele, J.P., Rudd, R.M., Balkwill, F.R., et al. (2006). In vivo loss of expression of argininosuccinate synthetase in malignant pleural mesothelioma is a biomarker for susceptibility to arginine depletion. *Clin. Cancer Res.* *12*, 7126–7131.
- Takeuchi, S., Wada, K., Toyooka, T., Shinomiya, N., Shimazaki, H., Nakanishi, K., Nagatani, K., Otani, N., Osada, H., Uozumi, Y., et al. (2013). Increased xCT expression correlates with tumor invasion and outcome in patients with glioblastomas. *Neurosurgery* *72*, 33–41.
- Tan, G.S., Lim, K.H., Tan, H.T., Khoo, M.L., Tan, S.H., Toh, H.C., and Ching Ming Chung, M. (2014). Novel proteomic biomarker panel for prediction of aggressive metastatic hepatocellular carcinoma relapse in surgically resectable patients. *J. Proteome Res.* *13*, 4833–4846.
- Tan, Y., Zavala, J.S., Xu, M., Zavala, J.J., and Hoffman, R.M. (1996). Serum methionine depletion without side effects by methioninase in metastatic breast cancer patients. *Anticancer Res.* *16*, 3937–3942.
- Tan, Y., Xu, M., Tan, X., Tan, X., Wang, X., Saikawa, Y., Nagahama, T., Sun, X., Lenz, M., and Hoffman, R.M. (1997a). Overexpression and large-scale production of recombinant L-methionine- α -deamino- γ -mercaptomethane-lyase for novel anticancer therapy. *Protein Expr. Purif.* *9*, 233–245.
- Tan, Y., Zavala, J.S., Han, Q., Xu, M., Sun, X., Tan, X., Tan, X., Magana, R., Geller, J., and Hoffman, R.M. (1997b). Recombinant methioninase infusion reduces the biochemical endpoint of serum methionine with minimal toxicity in high-stage cancer patients. *Anticancer Res.* *17*, 3857–3860.

- Tanaka, Y., Takahashi, T., Yamaguchi, K., Osada, S., Shimokawa, T., and Yoshida, K. (2016). Elemental diet plus glutamine for the prevention of mucositis in esophageal cancer patients receiving chemotherapy: a feasibility study. *Support. Care Cancer* 24, 933–941.
- Tao, K.M., Li, X.Q., Yang, L.Q., Yu, W.F., Lu, Z.J., Sun, Y.M., and Wu, F.X. (2014). Glutamine supplementation for critically ill adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2014.
- Thomas, X., and Le Jeune, C. (2016). Drug Evaluation Erythrocyte encapsulated l-asparaginase (GRASPA) in acute leukemia. *Int. J. Hematol. Oncol* 5, 11–25.
- Timmerman, L.A., Holton, T., Yuneva, M., Louie, R.J., Padró, M., Daemen, A., Hu, M., Chan, D.A., Ethier, S.P., van'tVeer, L.J., et al. (2013). Glutamine Sensitivity Analysis Identifies the xCT Antiporter as a Common Triple-Negative Breast Tumor Therapeutic Target. *Cancer Cell* 24, 450–465.
- Torres-Obreque, K., Meneguetti, G.P., Custódio, D., Monteiro, G., Pessoa-Junior, A., and de Oliveira Rangel-Yaguí, C. (2019). Production of a novel N-terminal PEGylated crisantaspase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 66, 281–289.
- Trachootham, D., Alexandre, J., and Huang, P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: A radical therapeutic approach? *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 579–591.
- Tsai, H.J., Jiang, S.S., Hung, W.C., Borthakur, G., Lin, S.F., Pemmaraju, N., Jabbour, E., Bomalaski, J.S., Chen, Y.P., Hsiao, H.H., et al. (2017). A Phase II Study of Arginine Deiminase (ADI-PEG20) in Relapsed/Refractory or Poor-Risk Acute Myeloid Leukemia Patients. *Sci. Rep.* 7, 1–10.
- Tsai, W. Bin, Aiba, I., Lee, S.Y., Feun, L., Savaraj, N., and Kuo, M.T. (2009). Resistance to arginine deiminase treatment in melanoma cells is associated with induced argininosuccinate synthetase expression involving c-Myc/HIF-1 α /Sp4. *Mol. Cancer Ther.* 8, 3223–3233.
- Tsujimoto, T., Yamamoto, Y., Wasa, M., Takenaka, Y., Nakahara, S., Takagi, T., Tsugane, M., Hayashi, N., Maeda, K., Inohara, H., et al. (2015). L-glutamine decreases the severity of mucositis induced by chemoradiotherapy in patients with locally advanced head and neck cancer: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Oncol. Rep.* 33, 33–39.
- Updike, S.J., Wakamiya, R.T., and Lightfoot, E.N. (1976). Asparaginase entrapped in red blood cells: Action and survival. *Science* (80-). 193, 681–683.
- Vala, A.K., Sachaniya, B., Dudhagara, D., Panseriya, H.Z., Gosai, H., Rawal, R., and Dave, B.P. (2018). Characterization of L-asparaginase from marine-derived *Aspergillus niger* AKV-MKBU, its antiproliferative activity and bench scale production using industrial waste. *Int. J. Biol. Macromol.* 108, 41–46.
- Vicentini, G.E., Fracaro, L., De Souza, S.R.G., Martins, H.A., Guarnier, F.A., and Zanoni, J.N. (2016). Experimental cancer cachexia changes neuron numbers and peptide levels in the intestine: Partial protective effects after dietary supplementation with l-glutamine. *PLoS One* 11.
- Vitvitsky, V., Thomas, M., Ghorpade, A., Gendelman, H.E., and Banerjee, R. (2006). A

- functional transsulfuration pathway in the brain links to glutathione homeostasis. *J. Biol. Chem.* *281*, 35785–35793.
- Vrooman, L.M., Supko, J.G., Neuberg, D.S., Asselin, B.L., Athale, U.H., Clavell, L., Kelly, K.M., Laverdière, C., Michon, B., Schorin, M., et al. (2010). Erwinia asparaginase after allergy to *E. coli* asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* *54*, 199–205.
- Vrooman, L.M., Kirov, I.I., Dreyer, Z.A.E., Kelly, M., Hijjiya, N., Brown, P., Drachtman, R.A., Messinger, Y.H., Ritchey, A.K., Hale, G.A., et al. (2016). Activity and Toxicity of Intravenous Erwinia Asparaginase Following Allergy to *E. coli*-Derived Asparaginase in Children and Adolescents With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* *63*, 228–233.
- Warrell, R.P., Chou, T.C., Gordon, C., Tan, C., Roberts, J., Sternberg, S.S., Philips, F.S., and Young, C.W. (1980). Phase I Evaluation of Succinylated Acinetobacter Glutaminase-Asparaginase in Adults. *Cancer Res.* *40*, 4546–4551.
- Whitecar, J.P., Bodey, G.P., Harris, J.E., and Freireich, E.J. (1970). L-Asparaginase. *N. Engl. J. Med.* *282*, 732–734.
- Williams, D.A. (2007). A New Mechanism of Leukemia Drug Resistance? *N. Engl. J. Med.* *357*, 77–78.
- Wriston, J.C.J., and Yellin, T.O. (1973). L-asparaginase: a review. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* *39*, 185–248.
- Yang, Z., Wang, J., Yoshioka, T., Li, B., Lu, Q., Li, S., Sun, X., Tan, Y., Yagi, S., Frenkel, E.P., et al. (2004a). Pharmacokinetics, Methionine Depletion, and Antigenicity of Recombinant Methioninase in Primates. *Clin. Cancer Res.* *10*, 2131–2138.
- Yang, Z., Wang, J., Lu, Q., Xu, J., Kobayashi, Y., Takakura, T., Takimoto, A., Yoshioka, T., Lian, C., Chen, C., et al. (2004b). PEGylation confers greatly extended half-life and attenuated immunogenicity to recombinant methioninase in primates. *Cancer Res.* *64*, 6673–6678.
- Yano, S., Li, S., Han, Q., Tan, Y., Bouvet, M., Fujiwara, T., and Hoffman, R.M. (2014). Selective methioninase-induced trap of cancer cells in S/G2 phase visualized by FUCCI imaging confers chemosensitivity. *Oncotarget* *5*, 8729–8736.
- Yano, S., Takehara, K., Zhao, M., Tan, Y., Han, Q., Li, S., Bouvet, M., Fujiwara, T., and Hoffman, R.M. (2016). Tumor-specific cell-cycle decoy by *Salmonella typhimurium* A1-R combined with tumor-selective cell-cycle trap by methioninase overcome tumor intrinsic chemoresistance as visualized by FUCCI imaging. *Cell Cycle* *15*, 1715–1723.
- You, X.-J., Xu, C., Lu, J.-Q., Zhu, X.-Y., Gao, L., Cui, X.-R., Li, Y., Gu, H., and Ni, X. (2011). Expression of cystathionine β -synthase and cystathionine γ -lyase in human pregnant myometrium and their roles in the control of uterine contractility. *PLoS One* *6*, e23788.
- Yu, M., Henning, R., Walker, A., Kim, G., Perroy, A., Alessandro, R., Virador, V., and Kohn, E.C. (2012). L-asparaginase inhibits invasive and angiogenic activity and induces autophagy in ovarian cancer. *J. Cell. Mol. Med.* *16*, 2369–2378.

- Zeng, X., Li, Y., Fan, J., Zhao, H., Xian, Z., Sun, Y., Wang, Z., Wang, S., Zhang, G., and Ju, D. (2013). Recombinant human arginase induced caspase-dependent apoptosis and autophagy in non-Hodgkin's lymphoma cells. *Cell Death Dis.* 4.
- Zhang, J., Fan, J., Venneti, S., Cross, J.R., Takagi, T., Bhinder, B., Djaballah, H., Kanai, M., Cheng, E.H., Judkins, A.R., et al. (2014). Asparagine plays a critical role in regulating cellular adaptation to glutamine depletion. *Mol. Cell* 56, 205–218.
- Zhang, W., Trachootham, D., Liu, J., Chen, G., Pelicano, H., Garcia-Prieto, C., Lu, W., Burger, J.A., Croce, C.M., Plunkett, W., et al. (2012). Stromal control of cystine metabolism promotes cancer cell survival in chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Cell Biol.* 14, 276–286.
- Zhao, H., Li, Q., Wang, J., Su, X., Ng, K.M., Qiu, T., Shan, L., Ling, Y., Wang, L., Cai, J., et al. (2012). Frequent Epigenetic Silencing of the Folate-Metabolising Gene Cystathionine-Beta-Synthase in Gastrointestinal Cancer. *PLoS One* 7, 3–8.
- Zhu, H., Li, T., Du, Y., and Li, M. (2018). Pancreatic cancer: Challenges and opportunities. *BMC Med.* 16, 18–20.
- Ziegler, T.R., Ogden, L.G., Singleton, K.D., Luo, M., Fernandez-Estivariz, C., Griffith, D.P., Galloway, J.R., and Wischmeyer, P.E. (2005). Parenteral glutamine increases serum heat shock protein 70 in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 31, 1079–1086.
- Zúñiga, M., Pérez, G., and González-Candelas, F. (2002). Evolution of arginine deiminase (ADI) pathway genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 25, 429–444.