

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Alžbeta Harárová

Zmeny v metabolizme nádorových buniek a ich využitie v terapii akútnych leukémií
Metabolic alterations in cancer cells and their implications in the therapy of acute
leukamias

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Júlia Starková, PhD.

Praha, 2016

Pod'akovanie:

Ďakujem svojej školiteľke Mgr. Júlii Starkovej, PhD. za jej čas, trpezlivosť a ochotu pri vypracovaní tejto bakalárskej práce. Ďalej ďakujem svojim rodičom a blízkym za podporu a trpezlivosť nielen pri štúdiu

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, 13.5.2016

Alžbeta Harárová

Abstrakt

Metabolizmus nádorových buniek sa odlišuje od metabolizmu zdravých buniek vo viacerých ohľadoch. Prvou popísanou odlišnosťou metabolizmu nádorových buniek bola aeróbná glykolýza, pri ktorej bunky konvertujú pyruvát na laktát aj za normoxických podmienok. Odlišnosti boli ďalej popísané v citrátovom cykle, v metabolizme aminokyselín (predovšetkým glutamínu, asparagínu a serínu) a tiež v metabolizme lipidov. Spoločným znakom týchto zmien je prevládanie anabolických dráh, umožňujúce rýchlu proliferáciu nádorových buniek.

Zvláštny význam má štúdium metabolizmu nádorových buniek rezistentných na liečbu, ktorých odlišný metabolický profil je nielen potenciálnym markerom, ale tiež terapeutickým cieľom.

Väčšina metabolických odlišností bola po prvýkrát popísaná v solídnych nádoroch, zatiaľ čo metabolizmu akútnej leukémie začala byť venovaná väčšia pozornosť až v posledných rokoch. Asparagináza je príkladom chemoterapie využívajúcej metabolickú odlišnosť leukemických buniek. Špecifický metabolizmus je tiež spájaný s rezistenciou buniek akútnej leukémie voči glukokortikoidom. Podrobné štúdium špecifického metabolizmu leukemických buniek objasnilo mechanizmus vzniku rezistencie voči asparagináze a tiež voči glukokortikoidom a naznačilo možné využitie týchto zmien v cielej terapii.

Kľúčové slová: metabolizmus, Warburgov efekt, glutamín, glykolýza, L-asparagináza, protinádorová terapia, rezistencia

Abstract

Cancer metabolism differs from that of the healthy cells in several aspects. Aerobic glycolysis (e.g. converting pyruvate to lactate under normoxic conditions) was the first described metabolic alteration of cancer cells. Metabolic alterations have since been described in the tricarboxylic acid cycle, oxidative phosphorylation, in the metabolism of amino acids (especially glutamine, asparagine and serine) and also in the metabolism of fatty acids and cholesterol. The common feature of these changes is the tendency to prefer anabolic pathways, thus enabling fast proliferation of cancer cells.

The study of cancer metabolism is particularly important in the case of cancer cells that show resistance to treatment, as their aberrant metabolism is not only a potential diagnostic marker but also a potential therapeutic target.

The majority of metabolic alterations have been described for the first time in solid tumors, whereas only recently has the metabolism of acute leukemias gained more attention. Asparaginase is an example of a chemotherapeutic agent that targets a metabolic alteration of leukemic cells. Distinct metabolic profile is also associated with the glucocorticoid resistance. Detailed study of the metabolic alterations of leukemic cells has elucidated the mechanisms of the asparaginase and glucocorticoid resistance and suggested a potential use of these alterations in the targeted therapy.

Key words: metabolism, Warburg effect, glutamine, glycolysis, asparaginase, anticancer therapy, resistance

Zoznam skratiek

Skratka	Pôvod skratky	Význam skratky
2-DG	2-deoxy-D-glucose	analóg glukózy, inhibítor hexokinázy
2-HG	2-hydroxyglutarate	
2-KG	2-ketoglutarate	
3-BrP	3-bromopyruvate	inhibítor glykolýzy
3PO	3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one	nízkomolekulárny inhibítor PFKBP
4E-BP1	eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein	proteín viažuci eukaryotický iniciačný faktor 4E
5mC	5-methylcytosine	
ACAT1	Acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase 1	
ACL	ATP dependent citrate lyase	
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside	aktivátor AMPK
Akt	Protein kinase B (PKB)	proteínkináza B, efektor PI3K
ALL	acute lymphoblastic leukemia	akútna lymfoblastická leukémia
ALL - BFM	ALL - Berlin - Frankfurt - Muenster	mezinárodná pracovná skupina detských hematológov
AML	acute myeloid leukemia	akútna myeloidná leukémia
AMPK	AMP activated kinase	proteínkináza aktivovaná AMP
ASNáza		Asparagináza
ASNS	Asparagine synthetase	
B-ALL	B cell acute lymphoblastic leukemia	akútna leukémia s nadmernou proliferáciou B buniek
Bax	Bcl-2 associated X protein	pro-apoptotický proteín asociovaný s proteínom Bcl-2
Bcl-2 rodina	B cell lymphoma 2	proteínová rodina regulátorov apoptózy
BPTES	5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide 3	inhibítor glutaminázy
CBS	cysthathione beta synthase	
CE	cholesterol ester	
CLL	chronic lymphoid leukemia	chronická lymfoidná leukémia
CML	chronic myeloid leukemia	chronická myeloidná leukémia
CPTI	Carnitine palmitoyltransferase I	
CS	Citrate synthase	
EPO	erythropoetine	
ER	Endoplasmatic reticulum	
F-2,6-BP	fructose-2,6-bisphosphate	
F6P	Fructose-6-phosphate	
FADH2	flavin adenine dinucleotide	oxidovaná a (redukovaná) forma flavínadenínudinukleotidu
FAO	Fatty acid oxidation	oxidácia mastných kyselín
FASN	Fatty acid synthase	
FBP	fructose-1,6-bisphosphate	

FH	Fumarase	
FLT3	Fms like tyrosine kinase 3	typ tyrozínkinázového receptoru, často mkutovaný u AML
G6P	Glucose-6-phosphate	
GA	Golgi apparatus	
GAP	GTPase activating protein	proteín aktivujúci GTPázu
GDH	Glutamate dehydrogenase	
GDP	guanosine diphosphate	
GK	glucocorticoids	
GLS	Glutaminase	
GLUT	Glucose transporter	
GR	Glucocorticoid receptor	
GTP	guanosine triphosphate	
HIF1	Hypoxia induced factor 1	transkripčný faktor aktivovaný hypoxiou
HK	hexokinase	
HLRCC	Hereditary leiomyomatosis and renal cancer cells	familiárny syndróm predisponujúci k benígnym nádorom
HRE	Hypoxia response element	sekvencia DNA viažuca HIF1
HSC	Hematopoetic stem cells	
CHOP	CCAAT/enhancer binding protein homologous transcriptional factor	iniciátor apoptózy pri nadmernom ER strese
IDH	Isocitrate dehydrogenase	
LDH	Lactate dehydrogenase	
LKB1	Liver kinase B 1	proteínová kináza B 1 izolovaná z pečene
MK		mastné kyseliny
mLST8	mammalian Lethal with SEC13 protein 8	proteín komplexu mTORC1 a mTORC2
MMP	Mitochondrial membrane potential	
MSC	Mesenchymal stem cells	
mSIN1	(mammalian Stress activated protein kinase interacting protein 1	
mTOR	mammalian Target of rapamycin	cicavčia forma TOR
NAD(H)	Nicotinamide adenine dinucleotide	oxidovaná a (redukovaná) forma nikotínamidadeníninukleotidu
OAA	oxalacetate	
OXPHOS	Oxidative phosphorylation	
p53	tumor supressor p53	
p70S6K	p70S6 kinase	proteínkináza ribozomálneho proteínu S6
PDH	pyruvate dehydrogenase	
PEP	phosphoenolpyruvate	
PFK-1	Phosphofructokinase 1	
PFKBP	Phosphofructokinase bisphosphatase	
PGI	phosphoglucose isomerase	
PHD	prolyl hydroxylase	prolylhydroxyláza
PHGDH	phosphoglycerate dehydrogenase	
PI2P	phosphatidyl inositol diphosphate	
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase	fosfatidylinozitol-3-kináza
PI3P	phosphatidyl inositol triphosphate	
PMK-1	Pyruvate kinase 1	

PML	Promyeloctic leukemia protein	proteín často translokovaný v bunkách promyeloctickej leukémie
PPAR	Peroxisome proliferator receptor	
PSAT	phosphoserine aminotransferase	
PTEN	Tumor phosphatase and tensin homologue	tumor supresorový proteín s fosfatázovou aktivitou
pVHL	von Hippel-Lindau protein	
Rag	Ras related GTP binding protein	GTP viažuci proteín príbuzný Ras proteínu
Raptor	Regulatory associated protein of TOR	proteín komplexu mTORC1
Rheb	Ras homolog enriched in brain	malý GTP viažuci proteín
Rictor	Rapamycin insensitive companion of mTOR	proteín komplexu mTORC2
ROS	reactive oxygen species	
RTK	Receptor tyrosine kinase	tyrozínkinázový receptor
SDH	Succinate dehydrogenase	
shRNA	short hairpin RNA	
STAT3	Signal transducer and activator 3	transkripčný faktor aktivovaný Janusovou kinázou
T-ALL	T cell acute lymphoblastic leukemia	akútna leukémia s nadmernou proliferáciou T buniek
TCA	Tricarboxylic acid cycle	citrátový cyklus
TET	Ten-eleven translocation protein family	proteínová rodina 2-KG depend. dioxygenáz
TSC1/2	Tuberous sclerosis complex 1 a 2	proteínový komplex mutovaný u pacientov s tuberóznou sklerózou
UCP	Uncoupling proteins	proteíny spôsobujúce rozpriahnutie dýchacieho reťazca
UPR	Unfolded protein response	odpoveď na akumuláciu nezložených proteínov v ER
VDAC	Voltage dependent anion channel	napäťovo závislý kanál na vonkajšej mitochondriálnej membráne
VEGF	Vascular endothelial growth factor	vaskulárny endotelový rastový faktor

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Typy leukémie a ich prevalencia.....	2
3. Signálne dráhy regulujúce metabolizmus v nádorových bunkách.....	3
3.1. PI3K/Akt/mTOR.....	3
3.2. LKB1/AMPK.....	4
3.3. Transkripčný faktor HIF1a.....	4
4. Špecifický metabolizmus nádorových buniek.....	5
4.1. Metabolizmus glukózy.....	5
4.1.1. Vstup glukózy do bunky.....	5
4.1.2. Regulácia glykolýzy v nádorových bunkách.....	6
4.1.2.1. Hexokináza.....	6
4.1.2.2. Fosfofruktokináza 1.....	6
4.1.2.3. Pyruvátkináza.....	7
4.1.3. Laktátdehydrogenáza.....	7
4.1.4. Využitie špecifického metabolizmu glukózy v terapii.....	7
4.1.4.1. Inhibícia vstupu glukózy do bunky.....	7
4.1.4.2. 2-deoxy-D-glukóza.....	8
4.2. Citrátový cyklus.....	10
4.2.1. Mutácie fumarázy a sukcinátdehydrogenázy.....	10
4.2.2. Mutácie izocitrátdehydrogenázy.....	11
4.2.2.1. Produkcia 2-hydroxyglutarátu.....	11
4.2.2.2. 2-HG ako inhibítor 2-KG dependentných dioxygenáz...	12
4.2.2.3. Metabolické zmeny buniek s mutáciou IDH1/2.....	13
4.2.2.4. Mutácie IDH1/2 ako prognostický marker u AML.....	13
4.2.2.5. Mutácie IDH1/2 v terapii AML.....	14
4.3. Oxidatívna fosforylácia.....	15
4.3.1. Metformín v terapii nádorových ochorení.....	15
4.4. Metabolizmus aminokyselín.....	15
4.4.1. Metabolizmus glutamínu v nádorových bunkách.....	15
4.4.2. Asparagináza v terapii leukémie.....	17
4.4.3. Metabolizmus serínu v nádorových bunkách.....	18
4.5. Metabolizmus lipidov.....	18
4.5.1. Syntéza mastných kyselín a cholesterolu.....	19
4.5.2. Oxidácia mastných kyselín.....	20
4.6. Metabolizmus rezistentných nádorových buniek.....	22
4.6.1. Rezistencia na glukokortikoidy v terapii ALL.....	22
5. Záver.....	24
6. Zoznam použitej literatúry.....	25

1. Úvod

V 20-tych rokoch minulého storočia si Otto Warburg všimol, že nádorové bunky prijímajú glukózu z média a produkujú laktát aj v prítomnosti dostatočného množstva kyslíka. Tento jav nazval „aeróbna glykolýza“, neskôr sa ujal pojem „Warburgov efekt“. Glykolýza a následná fermentácia pyruvátu na laktát poskytuje bunkám podstatne nižšie množstvo ATP než dekarboxylácia pyruvátu na acetylCoA nasledovaná citrátovým cyklom a oxidáciou redukovaných koenzýmov FADH₂ a NADH v dýchacom reťazci (čistý zisk 2 ATP vs. 34-36 ATP). Tento fakt viedol Warburga k formulovaniu hypotézy, že nádorové bunky majú poškodené mitochondrie a aeróbna glykolýza je pre ne spôsobom, ako sa vyrovnáť s neschopnosťou energeticky výhodnejšej oxidatívnej fosforylácie (Warburg, 1956). Na niekoľko nasledujúcich desaťročí sa toto vysvetlenie aeróbnej glykolýzy považovalo za dostatočné a pozornosť sa v oblasti onkologického výskumu presunula k onkogénom a tumor-supresorovým génom. Zmeny metabolizmu sú z tohto pohľadu sekundárnym javom: nadmerná proliferácia nádorových buniek vyžaduje dostatok ATP a metabolitov, čo vedie k prispôsobeniu metabolizmu týmto nárokom. Tento model však nevysvetľuje, prečo dávajú nádorové bunky prednosť menej efektívnej glykolýze pred oxidatívnou fosforyláciou napriek tomu, že Warburgova pôvodná hypotéza o nefunkčných mitochondriách sa ukázala byť nepravdivou. V nádorových bunkách sú aktívne metabolické dráhy, pre ktoré je prítomnosť intaktných mitochondrií zásadná a strata funkčných mitochondrií po aplikácii etídium-bromidu naopak znižuje onkogénny potenciál buniek (Cavalli et al, 1997). Možné vysvetlenie predstavuje model, podľa ktorého rastové faktory priamo menia metabolizmus nádorových buniek z katabolického (typického pre diferencované bunky) na anabolický, poskytujúci dostatok makromolekúl na tvorbu dcérskych buniek. V tomto svetle nie je limitujúcim zdrojom pre proliferujúce bunky dostatok ATP, ale dostatok redukovaných organických zlúčenín, potrebných pre syntézu stavebných častí buniek (Ward a Thompson, 2012 review). Pavlova a Thompson v roku 2016 zhotovili na základe zhodnotenia výsledkov intenzívneho výskumu v oblasti metabolizmu nádorových buniek v poslednej dekáde zoznam šiestich charakteristických znakov nádorového metabolizmu. Patrí medzi ne zvýšený príjem glukózy a aminokyselín z prostredia, neštandardné spôsoby príjmu živín (napr. tzv. entóza, pri ktorej bunka pohltí a použije ako zdroj energie inú bunku, práve nádorové bunky sú entoticky mimoriadne aktívne (Overholtzer et al, 2007)), zvýšená potreba redukovanej formy dusíka, využívanie intermediátov glykolýzy a citrátového cyklu na anabolické deje, zmeny v regulácii génovej expresie pôsobením metabolitov a zmeny v interakcii s mikroprostredím nádoru prostredníctvom zmeneného metabolizmu. Hoci sa tieto zmeny nevyskytujú vždy súčasne a vo všetkých typoch nádorových buniek, vo väčšine nádorových buniek sú prítomné

aspoň dve z nich, čo zdôrazňuje význam metabolizmu v nádorovej transformácii a zároveň to ukazuje smer možnej terapie nádorových ochorení. Klinicky významné sú taktiež popísané odlišnosti v metabolizme rezistentných nádorových buniek v porovnaní s nádorovými bunkami senzitívnymi (Stäubert et al, 2014 review). Rezistencia na chemoterapiu a následný relaps je najčastejším dôvodom mortality detských leukemických pacientov (Starý, 2010 review). Možné využitie špecifického metabolizmu rezistentných buniek ako terapeutického cieľa predstavuje potenciál pre výrazné zlepšenie prognózy pacientov s rizikom relapsu. Cieľom tejto bakalárskej práce je poskytnúť prehľad doteraz popísaných zmien v metabolizme nádorových buniek s príkladmi ich využitia v cielej terapii nádorových ochorení. Zvláštna pozornosť je venovaná metabolizmu a terapii akútnych leukémií.

2. Typy leukémie a ich prevalencia

Leukémia je najčastejším malígnym ochorením u detí vo veku do 15 rokov, tvorí 30 % všetkých onkologických ochorení v tejto vekovej skupine. Podľa klinických prejavov sa leukémia delí na akútnu a chronickú. Podľa vývojovej rady v hematopoéze, z ktorej je odvodená, sa delí na lymfoblastickú a myeloblastickú. 80 % prípadov leukémie u detí predstavuje akútna lymfoblastická leukémia (ALL), 15 % akútna myeloidná leukémia (AML), asi 5 % pripadá na deti s myelodysplastickým syndrómom a 2-3 % tvoria deti s chronickou myeloidnou leukémiou (CML) (Starý, 2010 review). Terapia leukémií zaznamenala v posledných desaťročiach významný pokrok. Česká Republika sa zapojila do medzinárodnej randomizovanej štúdie ALL IC-BFM 2002, v ktorej bolo medzi rokmi 2002 až 2007 liečených 5060 detí s ALL z 15 krajín sveta podľa štandardizovaného protokolu so stratifikáciou pacientov podľa rizika do troch skupín. Prežitie 5 rokov bez relapsu ochorenia od začiatku terapie sa podarilo dosiahnuť u 74 % pacientov a celkové prežitie 8 rokov od začiatku terapie sa podarilo dosiahnuť u 82 % všetkých pacientov bez ohľadu na mieru rizika (Starý et al, 2014). Pacienti s ALL väčšinou dobre reagujú na chemoterapiu, ktorá štandardne trvá 2 roky a pozostáva zo 4 fáz: indukcia remisie, konsolidácia, reindukcia remisie a nakoniec udržiavacia liečba. Za negatívne prognostické znaky možno považovať nepriaznivé genetické prestavby, absenciu skorej odpovede na liečbu a tiež vek do 1 roku života alebo nad 10 rokov (Cooper a Brown, 2014). V terapii sa používa vinkristín, kortikoidy (prednizon a dexametazon), asparagináza, cyklofosamid, methotrexát, merkaptopurinol, cytozín arabinozid a antracyklínové cytostatiká daunorubicín a doxorubicín. AML predstavuje 15 % prípadov leukémie u detí, úspešne je vyliečených 60 – 65 % pacientov. Liečba je v porovnaní v ALL kratšia, trvá necelý rok a využívajú sa pri nej antracyklíny a cytozín arabinozid (Starý, 2010 review).

3. Signálne dráhy regulujúce metabolizmus v nádorových bunkách

Prežívanie a proliferácia buniek je závislá na integrácii intracelulárnych a extracelulárnych podnetov a aktivácii, resp. inhibícii vhodných metabolických dráh. Podrobný prehľad koordinácie bunkovej signalizácie a metabolizmu presahuje svojou komplexnosťou cieľ tejto práce, preto budú v nasledujúcej časti predstavené len niektoré vybrané dráhy, ktoré sú najčastejšie spájané s nádorovou transformáciou a metabolickými zmenami.

3.1. PI3K/Akt/mTOR

Často mutovanou signálnou dráhou, podieľajúcou sa na regulácii metabolizmu, je v bunkách akútnych leukémií dráha fosfatidylinozitol-3-kináza, Akt a mTOR (PI3K/Akt/mTOR) (Kharas et al, 2010; Janes et al, 2010). mTOR (mammalian Target of rapamycin) je cicavčia varianta evolučne konzervovanej serín-treonínovej kinázy, ktorá integruje signály z prostredia a na ich základe reguluje rast, metabolizmus a proliferáciu buniek. mTOR tvorí proteínové komplexy 1 a 2 (mTORC1 a mTORC2), pričom lepšie popísaný je mTORC1. mTORC1 sa skladá z proteínov mTOR, Raptor (Regulatory associated protein of TOR) a mLST8 (mammalian Lethal with SEC13 protein 8), mTORC2 tvorí proteín mTOR asociovaný s proteínmi Rictor (Rapamycin insensitive companion of mTOR), mLST8 a mSIN1 (mammalian Stress activated protein kinase interacting protein 1) (Moschetta et al, 2014 review). Medzi doteraz najlepšie popísané efektory mTORC1 patrí ribozomálna kináza p70S6 (p70S6K) a proteín 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein). Fosforylácia p70S6K komplexom mTORC1 vedie k jej aktivácii a následnej fosforylácii a aktivácii ribozomálneho proteínu S6, naopak fosforylácia 4E-BP1 má za následok jeho uvoľnenie z väzby s eIF4E. Voľný eIF4E je zásadný pre iniciáciu translácie (Hara et al, 1998). Významným regulátorom aktivity mTORC1 je TSC1/2 (Tuberous sclerosis complex 1 a 2). TSC1/2 je tumor-supresorový proteínový komplex, ktorý inhibuje aktiváciu mTORC1 malým G proteínom Rheb tým, že vystupuje ako GAP (GTPase activating protein) a stimuluje premenu GTP, naviazaného na Rheb, na GDP. Rheb s naviazaným GDP sa nemôže viazať na mTORC1 a aktivovať ho (Inoki et al, 2003). Ochranným mechanizmom proti nadmernej aktivite mTORC1 v prípade inaktívacie TSC1/2 je transkripčným faktorom STAT3 (Signal transducer and activator 3) stimulovaná zvýšená expresia PTEN (Tumor phosphatase and tensin homologue). PTEN svojou fosfatázovou aktivitou mení PI3P (fosfatidylinozitol-3-fosfát) na PI2P (fosfatidylinozitol-2-fosfát) a tlmí tak aktivitu PI3K a Akt (Zha et al, 2011). Vzhľadom k významnej tumor-supresorovej funkcii PTEN sú jeho mutácie časté u pacientov s malígnymi ochoreniami, vrátane hematologických (Palomero et al, 2007). Zvýšenie aktivity mTORC1 pri dostatku aminokyselín je sprostredkovaná Rag proteínmi, patriacimi medzi malé GTPázy. Na rozdiel od väčšiny ostatných signálov, prítomnosť aminokyselín je signalizovaná priamou interakciou Rag proteínov s mTORC1 a pre aktiváciu nie je nutná prítomnosť TSC1/2. Mechanizmus, akým prítomnosť aminokyselín vedie

k aktivácii mTORC1, nie je presne popísaný, avšak predpokladá sa, že prítomnosť aminokyselín zrejme stimuluje Rag-proteínmi sprostredkovaný presun mTORC1 komplexu do perinukleárnej oblasti buniek, kde je prítomný jeho aktivátor Rheb (Sancak et al, 2008).

3.2. LKB1/AMPK

Proteín kináza aktivovaná AMP (AMPK) je regulačným uzlom, ktorý blokuje anabolické a podporuje katabolické dráhy pri nedostatku ATP. AMPK je serín-treonínová kináza, pozostávajúca z katalytickej alfa a regulačných beta a gama podjednotiek (Hardie et al, 1998 review). Gama podjednotka obsahuje 4 CBS (cystationín beta syntáza) domény, viažuce AMP. Väzba AMP na CBS domény vedie k alosterickej aktivácii AMPK a zároveň predchádza defosforylácii treonínu na pozícii 172 (Thr 172) v katalytickej podjednotke. Fosforylácia Thr 172 je nutná pre kinázovú aktivitu AMPK (Sanders et al, 2007). Aktivátorom AMPK je okrem iných tiež serín-threonínová kináza LKB1 (Liver kinase B1). Bunky s nefunkčnou LKB1 majú zníženú aktivitu AMPK, sú citlivé voči energetickému stresu a podliehajú vo vyššej miere apoptóze (Shaw et al, 2003). AMPK funguje ako senzor schopný zachytiť energetický stres v bunke prostredníctvom zníženého pomeru AMP/ATP a následne inhibovať energeticky náročné anabolické deje (Hardi et al, 1998 review).

3.3. Transkripčný faktor HIF1a

Metabolizmus bunky je okrem dostupnosti živín ovplyvnený tiež dostatkom kyslíka v prostredí. Hlavným regulátorom odpovede bunky na hypoxiu je HIF1 komplex (Hypoxia induced factor 1). HIF1 sa v podobe heterodiméru viaže na HRE (Hypoxia response element) cieľových génov a stimuluje ich transkripciu. Medzi gény, ktorých expresiu HIF1 zvyšuje, patrí okrem iných GLUT1, enzýmy glykolýzy, EPO (Erythropoetín) a VEGF (Vascular endothelial growth factor) (Firth et al, 1994). Heterodimér HIF1 sa skladá zo stabilnej beta podjednotky a podjednotky alfa, ktorá je za normoxických podmienok degradovaná ubiquitín-proteazómovým komplexom (Huang et al, 1998). Ubikvitinylácia je sprostredkovaná tumor-supresorovým proteínom VHL (von Hippel-Lindau) (Tanimoto et al, 2000). U človeka boli identifikované tri prollyl-4-hydroxylázy (PHDs), z ktorých má na reguláciu aktivity VHL zásadný význam PHD2 (Bruick a McKnight, 2001). Proteín VHL s hydroxylovanými prolínovými zvyškami je aktívny a ubiquitinyluje HIF1a, tá je následne degradovaná v proteazómovom komplexe a nedochádza k vytvoreniu heterodiméru HIF1 a aktivácii cieľových génov. PHDs patria medzi 2-KG dependentné dioxygenázy a v hypoxických podmienkach sú neaktívne. VHL s nehydroxylovanými prolínovými zvyškami nie je aktívny, podjednotka HIF1a nie je ubiquitinylovaná a po vytvorení komplexu HIF1a s HIF1b reguluje transkripciu cieľových génov (Berra et al, 2003).

4. Špecifický metabolizmus nádorových buniek

4.1. Metabolizmus glukózy

Glykolýza pozostáva z desiatich krokov, v ktorých z jednej molekuly glukózy vznikajú dve molekuly pyruvátu. Celý proces prebieha v cytoplazme a čistý energetický zisk predstavujú 2 molekuly ATP. Za aeróbnych podmienok je pyruvát dekarboxylovaný na acetylCoA pyruvátdehydrogenázovým enzýmovým komplexom (PDH) v matrix mitochondrií. Za anaeróbnych podmienok však absencia kyslíka ako konečného akceptora elektrónov znemožňuje fungovanie dýchacieho reťazca a pyruvát je redukovaný na laktát, čo umožňuje regeneráciu koenzýmov NAD a FAD. Fermentácia pyruvátu na laktát je energeticky menej výhodná než oxidácia v dýchacom reťazci, avšak umožňuje bunkám produkciu ATP aj v anaeróbnych podmienkach. Glykolýza nie je len lineárnou dráhou od glukózy k pyruvátu, medziprodukty môžu vstupovať do rôznych biosyntetických dráh, čo je zrejme dôvodom tendencie nádorových buniek k aeróbnej glykolýze (kapitola 1). U glioblastómových buniek je až 90 % glukózy a 60 % glutamínu premenených na laktát a pyruvát, v prípade glutamínu je vedľajším produktom NADPH (DeBerardinis et al, 2007). Odlišnosti v metabolizme glukózy v nádorových bunkách predstavujú potenciálny cieľ protinádorovej terapie.

4.1.1. Vstup glukózy do bunky

Prvým limitujúcim krokom v metabolizme glykolýzy je jej vstup do bunky. Do bunky sa glukóza dostáva pomocou dvoch typov transportérov: symportom so sodíkom alebo facilitovanou difúziou cez glukózový transportér. U človeka bolo doteraz popísaných 14 glukózových transportérov (GLUTs), GLUT5 je špecifický pre fruktózu. Najlepšie preskúmané sú GLUT1-4, GLUT4 je závislý na inzulíne a nachádza sa hlavne na povrchu svalových buniek a adipocytov (Thorens a Mueckler, 2010 review). Expresia inzulín dependentného GLUT4 v bunkách svalov a adipocytoch vyžaduje aktiváciu PI3K signálnej dráhy inzulínom (Stuart et al, 2008). Jedným z dôsledkov nadmernej aktivácie PI3K dráhy je zvýšená expresia GLUTs v nádorových bunkách. Inhibícia PI3K dráhy znižuje expresiu GLUT1 v bunkách nádoru pankreasu (Melstrom et al, 2009). V bunkách AML rezistentných na chemoterapiu sú zvýšené hladiny HIF1a a GLUT1 v porovnaní s bunkami senzitívnymi. Utláčanie GLUT1, prípadne HIF1a, pomocou shRNA vedie k zvýšeniu senzitivity a k indukcii apoptózy (Song et al, 2014). Expresiu GLUTs naopak tlmí tumor supresorový proteín p53, ktorý okrem priamej represie transkripcie GLUTs tiež ovplyvňuje transkripciu mnohých metabolických enzýmov a stimuluje katabolický metabolizmus. Jeho mutácia teda vedie k zvýšenej expresii GLUTs a k prevládnutiu anabolických dráh (Zawacka-Pankau et al, 2011).

4.1.2. Regulácia glykolýzy v nádorových bunkách

Glykolýza je regulovaná na troch hlavných úrovniach: v prvom kroku (premena glukózy na glukóza-6-fosfát (G6P)) katalyzovanom hexokinázou (HK), resp. glukokinázou v hepatocytoch, v treťom kroku katalyzovanom fosfofruktokinázou 1 (PFK1), ktorá katalyzuje premenu fruktóza-6-fosfátu (F6P) na fruktóza-1,6-bisfosfát (FBP), a v poslednom kroku, premene fosfoenolpyruvátu na pyruvát, katalyzovanom pyruvátkinázou (PMK). Z analýzy kinetických vlastností HK, PFK-1, PKM2 a LDH v 7 nádorových líniiach vyplýva, že pre rýchlosť glykolýzy je v nádorových bunkách limitujúca aktivita HK a PFK-1. Katalytická schopnosť PKM-2 a LDH v nádorových bunkách saturovaná nie je, ich úlohou je zrejme rýchle odstránenie koncových produktov glykolýzy (fosfoenolpyruvát a pyruvát). Tým sa predchádza inhibícii celej dráhy negatívnou spätnou väzbou a udržiava sa vysoká aktivita glykolýzy (Xie et al, 2016).

4.1.2.1. Hexokináza

Enzým katalyzujúci prvý krok glykolýzy sa u človeka nachádza v 4 izoformách: HK-I, HK-II, HK-III a HK-IV (Katzen a Schimke, 1965). HK-II je prevažujúcou izoformou v nádorových bunkách (Katic et al, 2012) a jej expresia koreluje s aktivitou Akt a zvýšenou hladinou HIF1a (Zhuo et al, 2015). HK-II sa viaže na napätovo závislý aniontový kanál (Voltage-dependent anion channel, VDAC) vo vonkajšej mitochondriálnej membráne. Táto väzba jej na jednej strane umožňuje prístup k ATP produkovanom mitochondriami a na druhej strane bráni translokácii pro-apoptického proteínu Bax z mitochondrií. V zdravých bunkách je translokácia Bax do mitochondrie nasledovaná uvoľnením cytochrómu c do cytoplazmy a spustením apoptózy. V bunkách nadexprimujúcich HK-II je tento mechanizmus inhibovaný (Pastorino et al, 2002). Inaktivácia HK-II pomocou shRNA a inhibícia 2-DG vedie k zníženiu proliferácie buniek málobunkového pľúcneho karcinómu (Wang et al, 2016).

4.1.2.2. Fosfofruktokináza 1

PFK-1 katalyzuje premenu G6P (glukóza-6-fosfát) na FBP (fruktóza-1,6-bisfosfát), tento krok determinuje vstup molekuly glukózy do glykolytickej dráhy. Na alosterickej regulácii aktivity PFK-1 sa podieľa viac ako 10 rôznych metabolitov (Schoeneberg et al, 2013). Z hľadiska nádorovej transformácie je významná alosterická aktivácia PFK-1 prostredníctvom F-2,6-BP (fruktóza-2,6-bisfosfát), produktu enzýmu 6-fosfofrukto-2-kinázy/fruktóza-2,6-bisfosfatázy (PFKBP, PFK-2). V prípade, že je PFKBP fosforylovaná regulačným enzýmom (napr. PKA – proteín kinázou A), prevláda jej fosfatázová aktivita. V opačnom prípade defosforylovaná PFKBP katalyzuje kinázovú reakciu. Chesney et al (2014) určili pomer kinázovej a fosfatázovej aktivity PFKBP v bunkách adenokarcinómu pľúc 4,3:1. Vyššia kinázová aktivita vedie k zvýšenej hladine F-2,6-BP a ten aktivovaním PFK-1 podporuje aktivitu glykolytickej dráhy. Inhibícia PFKBP v myšacom modeli

leukémie prostredníctvom nízkomolekulovej látky 3PO (3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one) viedla k zastaveniu proliferácie nádorových buniek (Clem et al, 2008).

4.1.2.3. Pyruvátkináza

U človeka boli popísané 4 izoformy pyruvátkinázy: L izoforma, prevažujúca v pečeni a obličkách (orgány glukoneogenézy), R izoforma v erythrocytoch, PKM1 exprimovaná v tukovom tkanive a vo svaloch, a PKM2 izoforma, typická pre embryonálne a nádorové bunky. Na rozdiel od ostatných izoformi nie je PKM1 regulovaná alostericky ani fosforyláciou a je konštitutívne aktívna. (Mazurek, 2011 review). Zmena izoformy PKM1 na ľahšie inhibovateľnú PKM2 izoformu v nádorových bunkách podporuje aktivitu glykolytickej dráhy zrejme v skorých fázach nádorovej transformácie. Naopak umlčanie PKM2 pomocou siRNA vedie k potlačeniu nádorovej transformácie (Wittwer et al, 2011). PKM1 a PKM2 sú kódované rovnakým génom a produkované alternatívnym zostrihom (Noguchi et al, 1986), pričom aktivita cMyc onkogénu vedie k preferenčnému zostrihu PKM2 formy (David et al, 2010). Na regulácii zostrihu sa podieľa aj mTORC1 a jeho inaktivácia vedie k zníženiu hladiny metabolických intermediátov a zníženiu expresie PKM2. Dôsledkom je zníženie aktivity glykolytickej dráhy a spomalenie až zastavenie proliferácie nádorových buniek (Sun et al, 2011). U myši, ktorým boli transplantované leukemické bunky s inaktivovanou PKM2, došlo k rozvinutiu ochorenia neskôr a postupovalo pomalšie než u myši s aktívnou PKM2. Zároveň bola u nich produkcia laktátu o 30 % nižšia než u buniek s aktívnou PKM2 a korelovala s pomalším nástupom a progresom ochorenia. Inhibícia PKM2 by teda mohla u pacientov s leukémiou viesť k spomaleniu progresu ochorenia (Wang et al, 2014).

4.1.3. Laktátdehydrogenáza

Konečný produkt glykolýzy, pyruvát, je za hypoxických podmienok konvertovaný LDH na laktát, pričom reakcia je reverzibilná. Kofaktorom je NADH a bunkám je tak umožnené regenerovať NAD iným spôsobom než v dýchacom reťazci. LDH sa u človeka nachádza v 5 izoformách. Vo všetkých prípadoch ide o tetramérnu štruktúru, ktorá sa ale líši zastúpením podjednotiek M (Muscle) a H (Heart), alternatívne sa používa značenie A a B (Krieg et al, 1967). Nádorové bunky exprimujú prevažne LDHA formu (Kolev et al, 2008). Fantin et al (2006) inhibíciou LDHA v bunkách nádoru prsníka ukázali, že aktivita LDHA je nutná pre udržanie vysokej aktivity glykolýzy a proliferácie nádorových buniek.

4.1.4. Využitie špecifického metabolizmu glukózy v terapii

4.1.4.1. Inhibícia vstupu glukózy do bunky

Pridanie protilátok proti GLUT1 ku kultúram bunkových línií malobunkového karcinómu pľúc a nádoru prsníka viedlo k zníženej proliferácii a ich podávanie súčasne s látkami bežne

používanými v chemoterapii zvyšovalo mieru apoptózy (Rastogi et al, 2007). Inhibícia GLUT1 pomocou shRNA vedie k zníženiu aktivity glykolytickej dráhy v nádorových bunkách žalúdka, výsledkom je potlačenie proliferácie nádorových buniek a apoptóza (Zhang et al, 2015). Bunky B-ALL exprimujú niekoľko členov GLUT rodiny. Hlavným transportérom je u nich GLUT1, nakoľko delécia GLUT1 vedie k zníženej aktivite anabolických dráh, zníženej hladine glykolytických intermediátov a k zvýšenej miere apoptózy. Metabolizmus B-ALL buniek je teda závislý na glykolýze a inhibítory GLUT1 by mohli mať pozitívny účinok na výsledky terapie (Liu et al, 2014). Kultivácia bunkových línií nádoru prsníka a nemalobunkového karcinómu pľúc v prítomnosti nízkomolekulárneho inhibítora GLUT1, WZB117 viedla k zníženiu hladiny metabolických enzýmov HK2 a PMK2, zníženiu produkcie laktátu a zníženej intracelulárnej hladine ATP. Výsledkom bolo zníženie aktivity Akt a mTORC1, zvýšenie aktivity AMPK a jej vplyvom inhibícia cyklínu E2, čo viedlo k zníženiu proliferácie a apoptóze (Liu et al, 2012). Leukemické bunky línie K562 sa v hypoxických podmienkach stávajú rezistentnými na daunorubicín. Podanie inhibítora GLUT1 floretínu v hypoxických podmienkach znižuje príjem glukózy o 60 % a zvyšuje citlivosť buniek na daunorubicín (Cao et al, 2006).

In vitro a u niektorých látok tiež in vivo na myších modeloch bol potvrdený antiproliferatívny a proapoptotický účinok inhibítorov GLUT1. Podávanie samotných inhibítorov metabolizmu glukózy nie je dlhodobo efektívne. Ideálnym prístupom by bol zrejme vývoj nízkomolekulárnych inhibítorov GLUT1 a ich použitie v kombinácii so štandardnou terapiou, nakoľko účinnosť tohto prístupu potvrdzujú in vitro štúdie.

4.1.4.2. 2-deoxy-D-glukóza

Jedným z prvých testovaných inhibítorov glykolýzy bola 2-deoxy-D-glukóza, analóg glukózy, ktorá má ale miesto hydroxylovej skupiny na uhlíku C2 naviazaný vodík. 2-DG prostredníctvom GLUTs vstupuje do buniek, kde sa stáva substrátom HK, ktorá ju fosforyluje na 6-fosfo-2-DG. Ďalším krokom glykolýzy je za fyziologických podmienok enzymatická reakcia fosfoglukóza izomerázy (PGI), ktorá ale nie je schopná katalyzovať izomerizáciu 6-fosfo-2-DG. Výsledkom je teda akumulácia 6-fosfo-2-DG v bunke, ktorá následne inhibuje glykolýzu (Sols et Crane, 1954). Podávanie 2-DG v kombinácii s adriamycínom a paclitaxelom zvyšuje cytotoxické účinky na nádorové bunky osteosarkómu a pľúcneho karcinómu (Maschek et al, 2004). Synergistický účinok s chemoterapeutikami bol pozorovaný aj v leukemických bunkách. Nakoľko zvýšená aktivita glykolytickej dráhy je sprievodným znakom buniek ALL rezistentných na glukokortikoidy, podávanie 2-DG ako inhibítora glykolýzy má synergistický účinok s GK a vedie k obnoveniu citlivosti rezistentných buniek (Eberhart et al, 2009). U buniek AML nesúcich sekundárnu

mutáciu FLT3 (Fms like tyrosin kinase 3) a rezistentných na sorafenib, resp. quizartinib, dochádza pri súčasnom podávaní 2-DG k obnoveniu citlivosti na tieto látky (Larrue et al, 2015).

Okrem inhibície glykolýzy sa na cytotoxických účinkoch 2-DG podieľa inhibícia N-glykozylácie. N-glykozylácia je jednou z posttranslačných modifikácií a začína v endoplazmatickom retikule (ER) na molekule dolicholu. Základom štruktúry sú 2 molekuly N-acetylglukozamínu, na ktorý je naviazaná manóza. Na molekule manózy potom začína bohaté vetvenie oligosacharidového reťazca, vetvená štruktúra je následne prenesená „en bloc“ na asparagínový zvyšok proteínu.

2-DG môže byť substrátom pre enzýmy, katalyzujúce pripojenie monosacharidov k oligosacharidovému reťazcu, avšak na rozdiel od manózy sa na 2-DG nemôže napojiť vetvená štruktúra (Datema et Schwartz, 1979). Dôsledkom je akumulácia nesprávne zložených N-glykozylovaných proteínov s nedokončenou oligosacharidovou zložkou v ER, to následne vyvolá tzv. „odpoveď na nezložené proteíny“ (unfolded protein response - UPR“), čo je fyziologický dej, ktorým sa bunka snaží dočasné zvýšenie množstva nezložených proteínov v ER zvládnuť a zabrániť apoptóze (Kurtoglu et al, 2007). Pri dlhotrvajúcom ER strese vyvolanom nadbytkom nesprávne zložených glykoproteínov sa však anti-apoptotická funkcia UPR vyčerpá a dôjde k spusteniu apoptózy, sprostredkovanej pomocou proteínu CHOP (CCAAT/enhancer binding protein homologous transcriptional factor) (Yamaguchi a Wang, 2004).

Inhibícia N-glykozylácie pôsobením 2-DG by mohla mať významný terapeutický potenciál pre bunky AML nesúce mutáciu povrchových tyrozín kinázových receptorov (RTK). Mutácie RTK sa často vyskytujú u pacientov s AML (Estey, 2012) a vedú ku konštitutívnej aktivácii PI3K a ďalších signálnych dráh, prispievajúcich svojou nadmernou aktivitou k nádorovej transformácii (Roumier et al, 2006). RTK sa nachádzajú na povrchu buniek a sú N-glykozylované, podávanie 2-DG znižuje ich počet na povrchu buniek a teda znižuje i aktivitu nimi aktivovaných signálnych dráh, čo vedie k zastaveniu proliferácie buniek a k zvýšenej miere apoptózy (Larrue et al, 2015).

U buniek ALL podanie 2-DG vedie k apoptóze už pri dávkach, ktoré pre iné nádorové bunky v aeróbných podmienkach nie sú toxické, pričom senzitivita B-ALL a T-ALL sa významne líši. U T-ALL bunkových línii dochádza k apoptóze v nižšej miere než u B-ALL. Hlavným mechanizmom navodzujúcim apoptózu je u týchto buniek zrejme práve inhibícia N-glykozylácie. Relatívna vyššia rezistencia pacientov s T-ALL na účinky 2-DG by mohla byť spôsobená pomerne vysokou prevalenciou inaktivujúcich PTEN mutácií v tomto subtype v porovnaní s B-ALL (Palomero et al, 2007). Inaktivácia PTEN vedie k nadmernej aktivite PI3K signálnej dráhy, čo zvyšuje aktivitu Akt. Vysoká hladina aktívnej Akt vedie k zvýšenej aktivite proteín kináz zapojených do UPR a spôsobuje tak vyššiu odolnosť T-ALL voči účinkom 2-DG. Podávanie 2-DG spolu s inhibítormi Akt by tak mohlo viesť k lepšej odpovedi T-ALL na liečbu pomocou 2-DG (DeSalvo et al, 2012). Účinky

2-DG sú závislé od typu nádoru, od vývojovej línie, a taktiež od individuálneho metabolického profilu jednotlivých buniek. Porovnanie odpovede dvoch bunkových línií AML ukázalo, že u buniek NB4, ktoré využívajú ako hlavnú metabolickú dráhu glykolýzu, dochádza k rýchlemu zastaveniu proliferácie. Naopak, účinky na líniu THP-1, ktorej metabolizmus je závislý od vysokej aktivity FAO (Suganuma et al, 2010), boli zanedbateľné. Súčasná inhibícia FAO pri podaní 2-DG viedla k apoptóze (Miwa et al, 2013). V súčasnosti neprebiehajú klinické testy, v ktorých by bola podávaná pacientom samotná 2-DG, vzhľadom k jej relatívnej neúčinnosti a faktu, že podávanie vysokých dávok 2-DG môže viesť u pacientov k systémovej toxicite (Stein et al, 2010; Raez et al, 2012).

4.2. Citrátový cyklus

Citrátový cyklus je centrálnou biochemickou dráhou, ktorá okrem redukovaných koenzýmov NADH a FADH₂ poskytuje bunkám prekursorov pre mnohé biosyntetické dráhy. V nádorových bunkách boli identifikované mutácie enzýmov citrátového cyklu, ovplyvňujúce ich prežívanie a proliferáciu (Pavlova a Thompson, 2016 review).

4.2.1. Mutácie fumarázy a sukcinátdehydrogenázy

Sukcinátdehydrogenáza (SDH) je enzým, katalyzujúci premenu sukcinátu na fumarát. Fumaráza (FH) následne konvertuje fumarát na malát. Bunky pacientov s dedičnou leiomyomatózou a renálnym karcinómom (Hereditary leiomyomatosis and renal cancer cells - HLRCC) majú mutácie v géne pre FH, čo vedie k aeróbnej glykolýze, zníženiu aktivity AMPK a zvýšeniu hladiny HIF1a (Tong et al, 2012). Podobné prejavy sú spájané s mutáciou SDH, typickou pre pacientov s paragangliómom a feocytochrómom (Baysal et al, 2000; Gimm et al, 2000). Zvýšená hladina HIF1a v bunkách nádorov s týmito mutáciami nekoreluje s denzitou kapilár a nie je spôsobená hypoxiou v mikroprostredí tumoru. Hlavným mechanizmom, zodpovedným za onkogénny potenciál mutácií FH a SDH sa teda zdá byť pseudohypoxia (Pollard et al, 2005). Selak et al (2005) analýzou vzoriek pacientov s nádorom s mutovanou SDH objasnili mechanizmus, akým môže absencia enzýmu TCA prispieť k pseudohypoxii: sukcinát môže prechádzať medzi mitochondriou a cytoplazmou. V cytoplazme kompetuje s 2-KG a inhibuje tak činnosť PHD (dekarboxylácia 2-KG na sukcinát je paralelne prebiehajúcou reakciou, bez ktorej PHD nemôže hydroxylovať prolínové zvyšky v proteíne VHL. Akumulácia sukcinátu v cytoplazme spôsobená mutáciou SDH, prípadne FH, tak vedie k inhibícii PHD, následnej stabilizácii HIF1a podjednotky a k zvýšeniu expresie HIF-1 indukovaných génov. Výsledkom je pseudohypoxický stav bunky a posun metabolizmu k aeróbnej glykolýze, ktorá podporuje proliferáciu buniek a nádorovú transformáciu.

4.2.2. Mutácie izocitrátdehydrogenázy

Izocitrátdehydrogenáza (IDH) je enzým TCA, ktorý oxidatívne dekarboxyluje izocitrát na alfa-ketoglutarát (2-KG) za súčasnej premeny NAD(P)⁺ na NAD(P)H. U človeka sa vyskytuje v troch izoformách: IDH3 je súčasťou TCA a využíva ako kofaktor NAD⁺. IDH1 a IDH2 sú príbuzné homodimerické proteíny so 70% zhodou v štruktúre, odlišnou od štruktúry IDH3, využívajúce ako kofaktor NADP. Líšia sa lokalizáciou v bunke: IDH2 je prítomná v matrix mitochondrií, zatiaľ čo IDH1 je lokalizovaná v cytoplazme a v peroxizómoch. (zhrnuté v Mellai et al, 2013). Mutácia v IDH1 bola prvýkrát preukázaná v bunkách izolovaných z gliómov rôznych štádií. Pri celogenómovej analýze glioblastómu bola u 12% vzoriek nájdená somatická mutácia v géne pre IDH1 v kodóne 132, kódujúcom arginín (Parsons et al, 2008). Následná analýza vzoriek gliómov odhalila prítomnosť bodovej substitučnej mutácie IDH1 R132 a mutácie IDH2 R172. Arginín na pozícii 132 u IDH1 je homologický s arginínom na pozícii 172 u IDH2 a v oboch prípadoch sa nachádza v katalytickom mieste enzýmu (Ward et al, 2010). V roku 2009 bola mutácia IDH1 prvýkrát objavená vo vzorkách pacientov s AML, najčastejší výskyt (16%) bol zaznamenaný u pacientov s normálnym cytogenetickým profilom (Mardis et al, 2009). Štúdie na myšacích modeloch naznačujú, že IDH1/2 mutácia nenavodzuje myelodyspláziu per se, ale v kombinácii s iným faktorom (napr. zvýšenou expresiou HOXA9) urýchľuje nástup ochorenia (Chaturvedi et al, 2013).

4.2.2.1. Produkcia 2-hydroxyglutarátu

Modely šiestich substitučných mutácií R132 IDH1, z ktorých každá bola predtým popísaná u pacientov s glioblastómom, ukázali, že všetky tieto mutácie významne ovplyvnia väzbu izocitrátu do katalytického miesta enzýmu (Zhao et al, 2009). Analýzou metabolického profilu glioblastómových bunkových línií s mutáciou R132H IDH1 bolo zistené, že bunky exprimujúce R132H IDH1 formu produkujú výrazné množstvo R(-) 2-hydroxyglutarátu (2HG), zlúčeniny, ktorá sa v bunkách s nemutovanou formou IDH1 vyskytuje v zanedbateľnom množstve. Štruktúrna analýza R132H IDH1 proteínu ukázala, že zámena arginínu za histidín vedie na jednej strane k zvýšenej afinite k NADPH a na druhej strane neprítomnosť guanidilovej skupiny arginínu v katalytickom mieste znižuje afinitu ku karboxylovej skupine izocitrátu. Analýza in vitro aktivity mutovanej formy IDH1 viedla k formulácii hypotézy, že mutácia IDH1 spôsobuje výrazný pokles citrát-dependentnej produkcie NADPH a naopak zisk 2-KG dependentnej spotreby NADPH, sprevádzanej priamou premenou 2-KG na 2-HG (Dang et al, 2009). NADPH-dependentná produkcia 2-HG bola potvrdená i u pacientov s AML, pričom hladina 2-HG nezávisela od typu substitúcie. Hladiny 2-KG, fumarátu, sukcinátu ani malátu neboli signifikantne zmenené v porovnaní s pacientami s nemutovanou formou IDH1/2. (Gross et al, 2010).

4.2.2.2. 2-HG ako inhibítor 2-KG dependentných dioxygenáz

Čo spôsobuje onkogénny potenciál jednoduchého metabolitu, akým je 2-HG? V ľudskom organizme sa vyskytuje viac ako 60 2-KG dependentných dioxygenáz, katalyzujúcich demetyláciu histónov a nukleových kyselín, regulujúcich stabilitu a vzájomné interakcie proteínov hydroxyláciou (Lu et al, 2012). Patrí medzi ne rodina histónových demetyláz, pre ktoré je charakteristická konzervovaná JumanjiC doména (JmjC). Súčasne s demetyláciou lysínových zvyškov histónov prebieha dekarboxylácia 2-KG na sukcinát (Tsukada et al, 2006). Ďalšou proteínovou rodinou patriacou medzi 2-KG dep. dioxygenázy je TET rodina 5-mC hydroxyláz TET1, TET2, TET3, katalyzujúcich premenu 5mC (5-metylcytozín) na 5hmC (5-hydroxymetylcytozín) (Tahiliani et al, 2009; Ito et al 2009). 5hmC je intermediátom demetylácie 5mC, vyskytuje sa najmä v kódujúcich oblastiach genómu a prevažuje v exónových sekvenciách (Xu et al, 2011). Štúdium jeho vplyvu na expresiu génov bolo komplikované faktom, že bisulfitová sekvenačná metóda, štandardne používaná na detekciu 5mC, nerozlišuje medzi 5mC a 5hmC (Huang et al, 2010). 5hmC je súčasťou dynamického procesu aktívnej demetylácie 5mC a je asociovaný prevažne so zvýšením expresie génov, hoci u niektorých génov bola pozorovaná negatívna korelácia medzi aktivitou TET, zastúpením 5hmC a génovou expresiou (Xu et al, 2011). Existencia veľkej skupiny 2-KG dependentných dioxygenáz a výskyt mutácií niektorých z týchto enzýmov u AML (Delhommeau et al, 2009; Lorsch et al, 2003) viedli k hypotéze, že 2-HG môže byť vzhľadom k veľkej štruktúrnej podobnosti s 2-KG kompetitívnym inhibítorom 2-KG dependentných dioxygenáz, a teda jeho zvýšená hladina vedie k ich zníženej aktivite a následne tak prispieva k nádorovej transformácii. Xu et al v roku 2011 in vitro a následne in vivo štúdiu potvrdili rolu 2-HG ako kompetitívneho inhibítora 2-KG, ktorého zvýšená hladina v bunke vedie k zníženiu aktivity 2-KG dependentných dioxygenáz. Ukázalo sa, že u pacientov s IDH1/2 je aktivita TET2 významne znížená, pričom mutácie TET2 a IDH1/2 sa nevyskytujú súčasne a spôsobujú podobný metylačný profil, čo naznačuje prelínajúci sa účinok a vzájomnú biologickú redundanciu. Mutácia IDH1/2 alebo inaktivácia TET2 vedú k zníženiu schopnosti diferenciácie u buniek myeloidnej vývojovej rady (Figureoa, 2010b). Jedným z dôležitých fenoménov pozorovaných u pacientov s AML je hypermetylácia genómu, na základe odlišného metylačného profilu je možné rozdeliť pacientov na definované podtypy (Figureoa et al, 2010a). Dva z týchto podtypov sú asociované s mutovanou IDH1/2, pričom pre tieto 2 skupiny je charakteristická celková hypermetylácia DNA v oblasti promótorov v porovnaní s pacientami s nemutovanou IDH1/2. Metylačné profily u IDH1 a IDH2 sa do značnej miery prelínajú, čo podporuje teóriu o vzájomnej biologickej redundancii IDH1 a IDH2 mutácií. V 45 hypermetylovaných oblastiach DNA, ktoré sú špecifické pre dva IDH1/2 DNA metylačné profily, sú významne zastúpené sekvencie viažuce transkripčné faktory GATA a EVI1, dôležité v procese myelodiferenciácie.

Neschopnosť buniek nesúcich IDH1/2 mutáciu viazať tieto transkripčné faktory by mohla vysvetliť ich stratu schopnosti diferenciácie. (Figureoa et al, 2010b).

4.2.2.3. Metabolické zmeny buniek s mutáciou IDH1/2

Porovnanie metabolického profilu gliómových buniek s mutáciou R132H IDH1 a R172K IDH2 ukázalo, že metabolické profily v prípade mutácie IDH1 vs. IDH2 sú navzájom značne podobné a zároveň sa odlišujú od metabolických profilov buniek s nemutovanou IDH1/2. Mutácia IDH1 je spojená so zvýšenou hladinou voľných AK, hlavne AK s rozvetveným reťazcom, naopak znížené sú hladiny glutamátu, čo by mohlo mať súvis s jeho premenou na 2-KG a následne 2-HG. Znížená je tiež hladina N-acetylovaných AK, čo by mohlo naznačovať zníženú produkciu acetylCoA, ktorá indikuje narušený metabolizmus lipidov (Reitman et al, 2011). Dysregulácii lipidového metabolizmu v súvislosti s mutáciou IDH1/2 nasvedčuje i znížená aktivita PI3K u buniek s AML (Birner et al, 2014). Medzi efektoxy PI3K patrí okrem iných ATP-citrát lyáza (ACL), syntáza mastných kyselín (FAS) a acetylCoAkarboxyláza (ACC), takže zníženie jej aktivity by mohlo mať za následok narušenie lipidového metabolizmu mutovaných buniek (Parker a Metallo, 2015 review). IDH1/2 vykazujú závislosť na glutamíne, čo by mohlo byť základom cielenej terapie AML s touto mutáciou (Dang et al, 2009; Emadi et al, 2014). Reitman et al pri analýze metabolického profilu IDH1/2 mutovaných buniek nepozorovali výrazné zmeny v aktivite enzýmov glykolytickej dráhy, neskoršia štúdia však ukázala, že v mutovaných bunkách boli znížené hladiny PDK1 (vedúce k zvýšenej aktivite PDH), HK2, PKM2 a LDHA, pričom hladina LDHA patrila k najvýraznejšie zníženým. Gliómové bunky s mutovanou IDH1/2 sú prvé ľudské nádorové bunky, u ktorých bolo pozorované zníženie expresie LDHA, a teda zníženie aktivity glykolytickej dráhy (Chesnelong et al, 2014).

4.2.2.4. Mutácie IDH1/2 ako prognostický marker u AML

Postoj k prognostickému významu IDH1/2 mutácie u AML je nejednoznačný. Metaanalýza 15 štúdií z rokov 2009-2011 preukázala kratšiu dobu prežívania v porovnaní s pacientami s nemutovanou IDH1/2. (Feng et al, 2012). Recentnejšie štúdie zaznamenali horšiu prognózu u oboch mutácií, žiaden vplyv na prognózu, horšiu prognózu len u pacientov s IDH2 mutáciou, prípadne dokonca lepšiu prognózu pacientov s IDH1/2 mutáciou (Yamaguchi et al, 2014; DiNardo et al, 2015; Balls et al, 2015; Emadi et al, 2015). Pre prognózu pacientov je zrejme zásadná súčasná prítomnosť iných mutácií (Green et al, 2010) a dôležitým faktorom je presná lokalizácia substituovanej aminokyseliny (Green et al, 2011).

4.2.2.5. Mutácie IDH1/2 v terapii AML

Snahy využiť mutáciu IDH1/2 v terapii pacientov s AML vychádzajú z dvoch odlišných prístupov. Prvým je tradičný postup hľadania priamych inhibítorov mutovaného onkogénu, druhým je cielená inhibícia dráh, od ktorých je daný nádor závislý. V roku 2013 Chaturvedi et al identifikovali potenciálny nízkomolekulárny inhibítor mutovanej IDH1, nazvaný HMS-101, viažuci sa do katalytického miesta enzýmu. In vitro štúdie potvrdili zníženú aktivitu mutantnej formy enzýmu a signifikantne zníženú hladinu 2-HG. U buniek z patientských vzoriek AML s mutáciou IDH1 HMS-101 selektívne navodzuje zastavenie bunkového cyklu a apoptózu. Wang et al v roku 2013 sledovali účinok sulfonylmočovínovej zlúčeniny, ktorú pomenovali AGI-6780, na enzymatickú aktivitu mutovaných foriem IDH1/2. AGI-6780 sa viaže do alosterického miesta R140Q IDH2 a nekompetitívne ju inhibuje. Naviazanie tohto inhibítora drží mutovaný dimér enzýmu trvalo v otvorenej konformácii, kedy nemôže dôjsť ku katalýze enzymatickej reakcie. AGI-6780 signifikantne znižuje hladinu 2-HG vo vzorkách pacientov s mutáciou IDH1/2. Zníženie hladiny 2-HG následne vedie u mutovaných buniek k obnoveniu schopnosti diferenciácie. AGI-6780 neinhibuje iné mutované formy IDH1/2, avšak pre pacientov s mutáciou R140Q IDH2 by mohla predstavovať potenciálnu cielenú terapiu. V súčasnosti prebiehajú klinické testy troch inhibítorov IDH1/2 od firmy Agios v spolupráci s Celgene Corporation (Agios, [online], [vid. 2. 5. 2016], dostupné z: <http://www.agios.com/pipeline-idh.php>): inhibítor mutovanej IDH1 AG-120, mutovanej IDH2 AG-221, a inhibítor oboch mutovaných foriem AG-881, všetky inhibítory sú zatiaľ vo fáze I klinických testov. Rovnako vo fáze I je momentálne inhibítor R132 IDH1 od firmy Novartis, nazvaný IDH305. V kontexte mutácie IDH1/2 bola identifikovaná ich závislosť na glutamíne. Porovnanie odpovede buniek AML pacientov s mutovanou, resp. nemutovanou formou IDH1/2 na BPTES, selektívny inhibítor glutaminázy (GLS) ukazuje, že inhibícia BPTES spomaľuje proliferáciu buniek s mutovanou formou IDH1/2, zatiaľ čo na proliferáciu buniek s nemutovanou formou IDH1/2 nemá vplyv (Emadi et al, 2014). Vzhľadom k tomu, že mutácia IDH1/2 samotná nenavodzuje leukemickú transformáciu a vyžaduje prítomnosť ďalšej mutácie (Chaturvedi et al, 2013), je možné očakávať, že terapia s použitím výhradne inhibítora IDH1/2 nebude účinná, a bude nutné ďalej skúmať možné kombinácie s dostupnými prípravkami (Levis, 2013 review). Momentálne je v štádiu testovania štúdia sledujúca účinok terapie kombinujúcej azacitidín s AG-221/AG-120 (National Library of Medicine a U.S. National Institutes of Health, [online], [vid.2.5.2016], dostupné z: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02677922?term=AG-221%2FAG-120&rank=2>)

4.3. Oxidatívna fosforylácia

Napriek tendencii nádorových buniek k aeróbnej glykolýze a preferenčnej premene pyruvátu na laktát je pre tieto bunky OXPHOS zásadná. Okrem produkcie samotného ATP je s mitochondriálnym membránovým potenciálom (MMP), generovaným v procese OXPHOS, úzko spojená regulácia apoptózy (Yadav a Chandra, 2013 review). Znížený MMP vedie k zmenám v štruktúre matrix mitochondrií a uľahčuje uvoľnenie cytochrómu c do intermembránového priestoru a následnú apoptózu (Gottlieb et al, 2003). Za určitých okolností však zníženie MMP naopak pôsobí antiapoptoticky, zrejme v dôsledku inhibície tvorby ROS (Samudio et al, 2009 review).

4.3.1. Metformín v terapii nádorových ochorení

V roku 2005 Evans et al na základe epidemiologickej štúdie predostreli hypotézu, že biguanid metformín, liek prvej voľby v terapii diabetu 2. typu, znižuje riziko onkologických ochorení u diabetických pacientov. Metaanalýza 28 štúdií potvrdila lepšiu prognózu u onkologických pacientov s diabetom 2. typu, liečených súčasne chemoterapiou a metformínom (Zhang a Li, 2014). Metformín inhibíciou komplexu I znižuje pomer ATP/AMP a aktivuje AMPK, ktorá následne inhibuje proliferáciu buniek (Xu et al, 2015). Podanie metformínu inhibuje rast bunkových línií nádoru ovárií a zvyšuje citlivosť myši s nádorom ovárií k paclitaxelu (Lengyel et al, 2014). U leukemických buniek rezistentných na 4-HPR (4-hydroxy(phenyl)retinamide) navodzuje metformín disipáciu MMP, zastavenie bunkového cyklu a apoptózu (Rodriguez-Lirio et al, 2015), podobný efekt má biguanid fenformín a aktivátor AMPK AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside). U buniek lymfómu a T-ALL s mutovaným PTEN, ktoré majú konštitutívne aktívny mTORC1, vedie podanie metformínu k aktivácii AMPK a inhibícii mTORC1, zároveň metformín zvyšuje citlivosť týchto buniek na dexametazon a 2-DG (Rosilio et al, 2013). Súčasné podanie metformínu by tak mohlo zvyšovať účinnosť štandardnej terapie. Inhibícia mTORC1 prostredníctvom zvýšenej aktivity AMPK by mohla predstavovať terapiu pre pacientov s mutáciou PTEN. V súčasnosti prebiehajú klinické štúdie sledujúce účinok kombinácie metformínu a štandardnej chemoterapie u pacientov s AML, resp. ALL (National Library of Medicine a U.S.National Institutes of Health, [online], [vid. 2.5.2016] dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=metformin+leukemia&Search=Search>).

4.4. Metabolizmus aminokyselín

4.4.1. Metabolizmus glutamínu v nádorových bunkách

Medzi metabolické zmeny nádorových buniek patria aj odlišnosti v metabolizme aminokyselín. Najväčšia pozornosť sa v doterajšom výskume sústredila na zmeny v metabolizme glutamínu,

ktorý je za normálnych okolností neesenciálnou aminokyselinou. V nádorových bunkách dochádza k zvýšeniu príjmu glutamínu z prostredia (Brand, 1985) a k zvýšenej aktivite glutaminázy (GLS), ktorá katalyzuje premenu glutamínu na glutamát. U človeka boli popísané dva gény, GLS1 a GLS2, kódujúce jednotlivé izoformy glutaminázy. GLS1 kóduje dve izoformy tohto enzýmu, KGA (kidney type glutaminase) a GAC (glutamináza C). Pre nádorové bunky je typická zvýšená expresia GLS1 (Pérez-Goméz et al, 2005), naopak GLS2 patrí medzi gény regulované p53 a má tumor-supresorovú funkciu (Szeliga et al, 2014). Nedostatok glutamínu vedie k apoptóze nádorových buniek, pričom tento efekt je možné tmiť pridaním intermediátov TCA do média (Yuneva et al, 2007). Regulátorom metabolizmu glutamínu je v nádorových bunkách onkogén Myc, ktorého zvýšená hladina vedie k zvýšenej expresii GLS, LDHA a tiež k zvýšenému príjmu glutamínu z média. Umlčanie MYC génu pomocou shRNA naopak tlmí závislosť buniek na glutamíne a takto modifikované bunky dokážu prežívať aj bez prítomnosti glutamínu v médiu (Wise et al, 2008). Zásadný význam glutamínu pre nádorové bunky spočíva v jeho univerzálnosti, čo predstavuje určitú paralelu k metabolizmu glukózy, ktorá tiež môže vstupovať do rôznych metabolických dráh v závislosti na aktuálnej situácii bunky. Zvýšený príjem glutamínu podporuje anabolický metabolizmus a proliferáciu nádorových buniek tým, že poskytuje aminoskupinu na gama uhlíku pre syntézu nukleotidov, dopĺňa intermediáty TCA a tým udržiava jeho aktivitu za súčasného odčerpávania citrátu pre syntézu mastných kyselín, je prekursorom neesenciálnych aminokyselín a zároveň zabezpečuje dostatok NADPH pre biosyntetické reakcie (De Berardinis et al, 2007)

GLS premieňa glutamín na glutamát, ktorý sa následne stáva substrátom glutamátdehydrogenázy (GDH), prípadne transaminázy (TA), a dopĺňa intermediáty TCA. Produktom reakcie GDH je 2-KG, produktom transaminačných reakcií je hlavne alanín. Intermediáty TCA môžu byť využívané v ďalších metabolických dráhach, malát môže byť transportovaný z mitochondrie do cytoplazmy a tam konvertovaný malátdehydrogenázou na pyruvát a následne LDHA na laktát, pričom produktom tejto reakcie je NADPH, nutný pre biosyntetické reakcie (Wise et Thompson, 2010 review).

Vzhľadom k významu glutamínu pre nádorové bunky by inhibícia metabolických dráh, na ktorých sa glutamín zúčastňuje, mohla byť potenciálnou cielenou terapiou. Jedným z možných cieľov terapie je inhibícia príjmu glutamínu z prostredia. Glutamín je do buniek transportovaný minimálne štyrmi rôznymi transportérmi, z ktorých zvlášť významný je transportér SLC1A5, kooperujúci s antiportérom SLC7A5/SLC3A2. SLC1A5 transportuje glutamín do bunky a ten je následne heterodimérom SLC7A5/SLC3A2 transportovaný z bunky do extracelulárneho prostredia výmenou za rozvetvené aminokyseliny, predovšetkým leucín. Inhibítor SLC1A5, GPNA

(L- γ -glutamyl-p-nitroanilide) inhibuje mTORC1 tým, že bráni vstupu glutamínu do bunky, ten následne nemôže byť vymenený za leucín a nedostatok leucínu vedie k inhibícii mTORC1 (Nicklin et al, 2009). Umlčanie génu SLC1A5 v bunkách pacientov s AML vedie k inhibícii mTORC1 a k zvýšenej miere apoptózy, podobný účinok má kultivácia izolovaných leukemických buniek v médiu bez prítomnosti glutamínu (Willems et al, 2013). Inhibíciu mTORC1 je tiež možné navodiť inhibíciou GLS pomocou látky DON (6-diazo-5-oxo-L-norleucine), podobný efekt má BPTES (bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulphide) a tiež umlčanie génu GDH pomocou siRNA. V bunkách s inaktivovanou GLS, prípadne GDH, nedochádza k translokácii mTORC1 do perinukleárnej oblasti buniek a teda nemôže dôjsť ku kontaktu s Rheb a následnej aktivácii mTORC1. Glutaminolýza stimuluje u Rag proteínov výmenu GTP za GDP a tým zvyšuje ich aktivitu a následne transport mTORC1 do blízkosti aktivátora Rheb, jej inhibícia by preto mohla byť ďalším terapeutickým cieľom v bunkách s abnormalitami v metabolizme glutamínu (Durán et al, 2012). Inhibícia GLS1 pomocou látky CB-839 vedie k apoptóze buniek AML bez výrazných cytotoxických účinkov na zdravé bunky a zároveň táto látka zvyšuje citlivosť buniek AML voči apoptóze navodenej podaním ABT-199, inhibítora antiapoptotického proteínu Bcl-2 (Jacque et al, 2015).

4.4.2. Asparagináza v terapii leukémie

Glutaminázová aktivita bola popísaná aj u asparaginázy (ASNázy), látky používanej v terapii ALL a niekoľkých ďalších hematologických malignít od 70-tych rokov, po tom, ako bola v 60-tych rokoch identifikovaná ako látka, zodpovedná za inhibíciu proliferácie buniek lymfómu po pridaní séra z morčáťa (Broome, 1963). Asparagín, podobne ako glutamín, nie je pre zdravé bunky esenciálnou aminokyselinou, nakoľko ľudské bunky exprimujú gén pre asparagín syntetázu (ASNS). Expresia tohto génu je ale u leukemických buniek nízka, čo ich predurčuje k citlivosti na podanie ASNS. Hladina expresie ASNS však paradoxne nekoreluje s rezistenciou buniek ALL na ASNázu a podanie ASNázy nevedie k zvýšeniu expresie ASNS (Hermanova et al, 2012). ASNáza katalyzuje hydrolyzu asparagínu na aspartát a amoniak, prípadne glutamát a amoniak, čím znižuje hladiny asparagínu a glutamínu v sére a navodzuje tak apoptózu leukemických buniek, ktoré sú na asparagíne a glutamíne závislé. ASNáza je produkovaná viacerými bakteriálnymi kmeňmi, v klinickej praxi sa používa enzým získaný z kmeňov *Escherichia coli* a *Erwinia carotovora*, ktoré sa okrem iného líšia tiež mierou glutaminázovej aktivity (Ali et al, 2015 review). Glutaminázová aktivita ASNázy bola v minulosti považovaná za príčinu výrazných vedľajších účinkov a prevládala snaha o získanie enzýmu bez tejto aktivity (Ramya et al, 2011), avšak v súčasnosti začína prevládať názor, že glutaminázová aktivita je zásadná pre navodenie cytotoxického účinku ASNázy. Mutované formy ASNázy bez glutaminázovej aktivity majú nižšiu účinnosť v navodení apoptózy buniek ALL (Parmentier et al, 2015). In vitro aj in vivo štúdie

preukázali schopnosť adipocytov tlmiť účinok ASNázy na bunky ALL sekretovaním glutamínu do média, pričom toto pozorovanie by mohlo čiastočne vysvetľovať vyšší výskyt relapsu u obéznych detí s ALL, liečených ASNázou, v porovnaní s deťmi, ktoré obézne nie sú (Ehsanipour et al, 2013). V bunkách AML viedlo podanie ASNázy k inhibícii mTORC1 a následnej apoptóze, avšak tento efekt bol čiastočne tlmený súčasnou stimuláciou glutamín syntetázy (GS), ktorá katalyzuje premenu glutamátu na glutamín. Podanie ASNázy a zároveň umlčanie GS génu pomocou shRNA viedlo u niektorých AML línií k zvýšeniu apoptózy, čo by naznačovalo možné zvýšenie účinnosti ASNázy súčasnou inhibíciou metabolizmu glutamínu (Willems et al, 2013). Okrem inhibícii mTORC1 znížením hladiny glutamínu v bunke je ďalším možným mechanizmom, ktorým ASNáza ovplyvňuje prežívanie leukemických buniek, zníženie mitochondriálneho membránového potenciálu inhibíciou TCA (Sugimoto et al, 2015).

4.4.3. Metabolizmus serínu v nádorových bunkách

Metabolizmus glutamínu úzko súvisí s metabolizmom serínu, nakoľko inhibícia kľúčových enzýmov glutamínového metabolizmu vedie u leukemických buniek k zvýšeniu expresie fosfoglycerát dehydrogenázy (PHGDH) a fosfoserín aminotransferázy (PSAT). Umlčanie týchto enzýmov pomocou siRNA, prípadne absencia serínu v médiu, zvyšujú citlivosť leukemických buniek na inhibítory metabolizmu glutamínu. Súčasná inhibícia metabolizmu glutamínu a serínu by tak mohla zvýšiť účinnosť terapie. Nakoľko metabolizmus serínu zrejme umožňuje leukemickým bunkám prežiť inhibíciu glutamínového metabolizmu, mohla by táto súčasná inhibícia tiež predstavovať možný prístup k terapii pacientov s rezistenciou na inhibítory glutamínového metabolizmu (Polet et al, 2015).

4.5. Metabolizmus lipidov

Za fyziologických podmienok sú nároky buniek pokryté príjmom exogénnych lipidov a de novo syntéza mastných kyselín (MK) je udržiavaná na nízkej hladine. Význam syntézy MK spočíva hlavne v uložení energie z nadbytku prijatých sacharidov vo forme lipidov, nakoľko oxidácia lipidov poskytuje približne dvojnásobok ATP v porovnaní so sacharidmi (Carracedo et al, 2013 review). Syntéza MK prebieha na multienzymovom komplexe syntáza mastných kyselín (FASN), ktorá predstavuje homodimér z dvoch 270-kilodaltonových polypeptidových reťazcov, pričom každý reťazec obsahuje 7 funkčných domén (Maier et al, 2006). Primerom pre syntézu MK je acetyl-CoA, ku ktorému sú postupne pridávané dvojuhlíkaté zvyšky pochádzajúce z malonyl-CoA. Malonyl-CoA je produkovaný enzýmom acetyl-CoA karboxyláza (ACC) a funguje zároveň ako inhibítor karnitínpalmitoyltransferázy 1 (CPT1), ktorá translokuje MK z cytosolu do matrix mitochondrie, kde prebieha FAO. MK, rovnako ako acetyl-CoA, totiž nedokážu prestúpiť

mitochondriálnou membránou. Inhibícia CPT1 prostredníctvom malonyl-CoA bráni simultánne prebiehajúcej syntéze a degradácii MK. Vzhľadom na to, že FASN je lokalizovaná v cytosole a PDH, produkujúca acetyl-CoA, sa nachádza v matrix mitochondrií, je nutné vznikajúci acetylCoA transportovať z mitochondrie do cytosolu. Enzým citrát syntáza (CS) katalyzuje vznik citrátu z acetyl-CoA a oxaloacetátu (OAA). Citrát má v mitochondriálnej membráne prenášač a po transporte do cytosolu a je enzýmom ATP-dependentná citrátlyáza (ACL) štiepený späť na acetylCoA a OAA. AcetylCoA môže byť potom využitý na syntézu MK, zatiaľ čo OAA je konvertovaný na malát a transportovaný späť do mitochondrie.

4.5.1. Syntéza mastných kyselín a cholesterolu

V nádorových bunkách dochádza k deregulácii lipidového metabolizmu. Akumulácia esterov cholesterolu v bunkách nádoru prostaty koreluje s agresivitou nádoru a je navodená zvýšenou aktivitou PI3K/Akt/mTOR dráhy v dôsledku mutácie PTEN. Inhibícia enzýmu ACAT1 (Acyl koenzým A: cholesterol acyltransferáza 1) vedie k zvýšenej miere apoptózy (Yue et al, 2014). V bunkách lymfoblastickej leukémie sa 40 % cholesterolu nachádza vo forme esterov a 60 % predstavuje voľný cholesterol, zatiaľ čo v zdravých bunkách predstavuje voľný cholesterol 90 % celkových zásob cholesterolu. Expresia ACAT1 je dvojnásobná v porovnaní so zdravými bunkami a jej inhibícia vedie k apoptóze. Voľný cholesterol je v bunkách transportovaný k cytoplazmatickej membráne a zabudovaný hlavne do oblasti lipidových raftov, v ktorých sa kumulujú receptory pre rastové faktory. Zmena metabolizmu cholesterolu a znížená hladina voľného cholesterolu v leukemických bunkách tak môže ovplyvňovať signalizáciu medzi bunkami (Mulas et al, 2011). V porovnaní so zdravými bunkami je v nádorových bunkách výrazne aktívnejšia FASN, pričom táto aktivita koreluje s agresivitou daného nádoru a pravdepodobnosťou výskytu rezistencie (Milgraum et al, 1997). Nízkomolekulárny špecifický inhibítor FASN, látka C93, znižuje výskyt nádorov u myši s nemálobunkovým pľúcnym karcinómom (Orita et al, 2007). Kľúčovým krokom v syntéze MK je rozštiepenie citrátu v cytoplazme na acetyl-CoA a OAA. Transkripcia ACL, enzýmu, ktorý katalyzuje túto reakciu, je regulovaná signálnou dráhou PI3K/Akt v odpovedi na inzulín a rastové faktory. Umlčanie génu ACL pomocou shRNA vedie k spomaleniu proliferácie nádorových buniek. (Bauer et al, 2005). K zvýšeniu expresie enzýmov zapojených do syntézy lipidov dochádza už v skorých štádiách nádorovej transformácie (Piyathilake et al, 2000). Zvýšená hladina MK zvyšuje proliferáciu buniek nielen poskytovaním fosfolipidov na stavbu biomembrán, ale aj ovplyvňovaním signálnych dráh v bunke (Vazquez-Martin et al, 2008). Vzhľadom k absencii enzýmu d12-desaturáza nie sú ľudské bunky schopné produkovať omega 3 a omega 6 nenasýtené MK. Zvýšená de novo lipogenéza preto vedie k zvýšeniu podielu nasýtených MK vo fosfolipidoch bunkových membrán. Nasýtené MK sú odolnejšie voči oxidácii vplyvom ROS a v súlade s týmto

faktom inhibícia de novo lipogenézy v nádorových bunkách vedie k ich zvýšenej citlivosti k apoptóze navodenej oxidačným stresom. Ďalšou výhodou vyššieho percentuálneho zastúpenia nasýtených MK v membráne môže byť zmena jej vlastností: zvýšený podiel nasýtených MK v membráne totiž znižuje jej laterálnu aj transverzálnu dynamiku. Pre niektoré chemoterapeutiká, napr. doxorubicín, je pasívny flip-flop prenos (t.j. dej, kedy dochádza k spontánnemu premiestneniu molekuly fosfolipidov z jednej monomolekulárnej vrstvy biomembrány do druhej) hlavným mechanizmom vstupu do buniek (Regev a Eytan, 1997). Bunky nádoru prostaty s vyššou aktivitou de novo lipogenézy sú rezistentnejšie voči doxorubicínu a inhibícia syntézy MK vedie k zvýšeniu podielu nenasýtených MK v membráne, zvýšeniu ich citlivosti a akumulácii doxorubicínu v bunkách (Rysman et al, 2010).

4.5.2. Oxidácia mastných kyselín

Oxidácia mastných kyselín (FAO) je séria reakcií, v ktorých sú MK postupne štiepené na acetyl-CoA. Ten môže následne vstúpiť do TCA, resp. byť využitý pri syntéze MK, cholesterolu či v acetylačných reakciách. Okrem acetyl-CoA vznikajú redukované koenzýmy FADH₂ a NADH, ktoré sú následne oxidované v dýchacom reťazci. FAO teda vyžaduje prítomnosť kyslíku. Jedným z mechanizmov, ktorými zvýšená aktivita FAO prispieva k lepšiemu prežívaniu nádorových buniek je zvýšená produkcia ATP a v jej dôsledku prekonanie obdobia metabolického stresu (Carracedo et al, 2013 review). Pre nádory odvođené z epitelových buniek nastáva toto obdobie bezprostredne po strate kontaktu s ostatnými bunkami a podložkou, kedy dochádza k zníženému príjmu glukózy z okolia a zvýšeniu hladiny ROS v bunke. Pokiaľ bunka nedokáže zapojiť mechanizmy, ktorými nedostatok ATP a nadbytok ROS prekoná, je výsledkom takéhoto metabolického stresu apoptóza. V nádorových bunkách preto po strate kontaktu s podložkou dochádza k zvýšeniu aktivity FAO, ktorá poskytuje potrebný ATP (Schafer et al, 2009). FAO je v nádorových bunkách stimulovaná prostredníctvom AMPK a proteínu promyelocytickej leukémie (PML). Tento tumor-supresorový proteín sa vyskytuje v jadrách buniek v tzv. PML telieskach a je spájaný s inhibíciou proliferácie nádorových buniek. Bol pomenovaný podľa typu leukémie, u ktorého často dochádza k jeho translokácii (Haupt et al, 2013). V bunkách nádoru prsníka expresia PML koreluje so zhoršením prognózy pacientov a agresivitou ochorenia. Expresia PML vedie k deacetylácii a aktivácii transkripčného kofaktora PGC1A (PPAR γ coactivator 1A), ktorý následne aktivuje PPAR γ (Peroxisome proliferator activated receptor gama) (Carracedo et al, 2012). PPAR γ patrí do rodiny nukleárných receptorov, ktoré po naviazaní ligandu regulujú expresiu génov kódujúcich enzýmy zapojené do FAO (Forman et al, 1997). PML teda cez PGC1A a PPAR γ stimuluje v nádorových bunkách prsníka FAO, čím pomáha nádorovým bunkám vyrovnáť sa s metabolickým stresom (Carracedo et al, 2012). Ito et al (2012) identifikovali prítomnosť PML a v jeho dôsledku stimuláciu FAO v zdravých HSC (Hematopoietic stem cell) ako

nutný predpoklad ich asymetrického delenia. Delécia PML, prípadne inhibícia FAO podaním etomoxiru (inhibítor CPT1) vedie k diferenciacii buniek a vyčerpaniu zásob nediferencovaných HSC.

Leukemické bunky kultivované na vrstve mezenchymálnych kmeňových buniek kostnej drene (Mesenchymal stem cells, MSC) produkujú vyššie množstvo laktátu bez súčasného zvýšenia príjmu glukózy. Kultivácia HSC s MSC, imitujúca mikroprostredie kostnej drene, vedie u HSC k zvýšeniu premeny pyruvátu na laktát. Zároveň dochádza v týchto bunkách k zníženiu MMP v dôsledku tzv. rozpriahnutia dýchacieho reťazca (uncoupling), kedy dochádza k oddeleniu redukcie kyslíka a tvorby ATP, ktoré sú za normálnych okolností spolu úzko prepojené. K rozpriahnutiu dochádza vplyvom zvýšenej aktivity UCP2 (Uncoupling protein 2), patriaceho do rodiny uncoupling proteínov (Samudio et al, 2008). Uncoupling proteíny (transportéry iónov) znižujú protónový gradient a MMP (Brand et Esteves, 2005 review). Podanie etomoxiru vedie u leukemických buniek kultivovaných v prítomnosti MSC k zníženiu spotreby kyslíka. Zdrojom redukovaných koenzýmov pre oxidáciu v rozpriahnutom dýchanom reťazci sú teda v leukemických bunkách zrejme mastné kyseliny (Samudio et al, 2009 review). Zníženie MMP v dôsledku zvýšenej expresie UCP2 v bunkách nádoru hrubého čreva je spojené so zvýšenou rezistenciou k chemoterapeutikám a chráni bunky pred apoptózou (Derdak et al, 2007). Podanie etomoxiru leukemickým bunkám kultivovaným v prítomnosti MSC vedie k zastaveniu ich proliferácie a zvýšeniu citlivosti voči induktoru apoptózy ABT-737. Podobný efekt má i podanie orlistatu, inhibítora FASN. FAO má v leukemických bunkách teda zrejme dve základné funkcie: na jednej strane umožňuje využitie glukózy na biosyntetické reakcie tým, že bráni oxidácii pyruvátu v TCA. Na druhej strane poskytuje acetyl-CoA pre TCA a tým udržiava transport elektrónov dýchacím reťazcom, čo podľa autorov tejto štúdie vedie v dôsledku zníženia MMP k zvýšeniu rezistencie na apoptózu (Samudio et al, 2010). ST-1326, inhibítor CPT1A, znižuje proliferáciu leukemických buniek a vedie k apoptóze. Inhibícia FAO by teda mohla predstavovať ďalší potenciálny cieľ protinádorovej terapie (Ricciardi et al, 2015). Podanie L-asparaginázy (ASNáza) bunkám ALL vedie k zmenám v ich metabolizme v snahe vyrovnať sa s navodeným stresom. Jednou zo zmien je i zvýšenie aktivity FAO v dôsledku inhibície mTORC1, pričom inhibícia FAO podaním etomoxiru zvyšuje citlivosť buniek ALL na ASNS. Inhibícia FAO v kombinácii s ASNázou by tak mohla byť ďalším prístupom k terapii leukémií s využitím ich pozmeneného metabolizmu (Hermanova et al, 2015). Inhibítory FAO by mohli byť stratégiou i v terapii pacientov s CLL, u ktorých dochádza k rezistencii na GK. Podávanie GK aktivuje PPARa a vedie k zvýšeniu aktivity FAO ako záchranného mechanizmu, ktorým sa leukemické bunky snažia

prekonať inhibíciu glykolýzy. Inhibícia PPARa súčasne s inhibíciou FAO obnovuje v rezistentných bunkách CLL citlivosť na GK (Tung et al, 2013).

Zvýšená odolnosť k apoptóze u leukemických buniek v dôsledku zníženého MMP ako výsledku pôsobenia UCP2 sa zdá byť v rozpore s pozorovaním, že zníženie MMP inhibíciou OXPHOS vedie k uvoľneniu cytochrómu c do intermembránového priestoru a k apoptóze (viď Kapitola 4.3.1. Inhibícia oxidatívnej fosforylácie). Možným vysvetlením je, že znížený MMP vedie k inhibícii tvorby ROS po podaní chemoterapeutík (Derdak et al, 2007). Znížená tvorba ROS môže pôsobiť ako obranný mechanizmus proti apoptóze (Samudio et al, 2009 review). Zníženie tvorby ROS a zároveň zvýšenie presunu cytochrómu c do medzimembránového priestoru sú indukované znížením MMP, pričom vo vzťahu k apoptóze pôsobia antagonisticky. Je možné, že o efekte zníženého MMP rozhoduje to, či je nádorová bunka vystavená pôsobeniu chemoterapie, prípadne konkrétny typ chemoterapie.

Samudio et al však vo svojich článkoch z roku 2008 a 2010, ani v prehľadovom článku z roku 2009, nevysvetľujú, akým spôsobom vedie rozpriahnutie dýchacieho reťazca k inhibícii tvorby ROS. Transport elektrónov cez komplexy dýchacieho reťazca totiž pretrváva aj v situácii, kedy je MMP znížený účinkom UCP2, a teda by sa dalo očakávať skôr zvýšenie hladiny ROS pri zvýšenej FAO. Rovnako sa Samudio et al nepokúsili interpretovať výsledky svojich experimentov vzhľadom k experimentom skupiny Gottlieb et al (2003), ktorá pozorovala zvýšenie citlivosti na apoptózu vplyvom zníženého MMP. Presný vzťah medzi znížením MMP, apoptózou a rezistenciou buniek na chemoterapiu si teda zrejme bude žiadať ďalší výskum.

4.6. Metabolizmus rezistentných nádorových buniek

Sľubným prístupom k terapii rezistencie u nádorových buniek sa zdá byť využitie odlišného metabolizmu nádorových buniek. Zmeny v metabolizme nádorových buniek im nielen umožňujú rýchlejšiu proliferáciu, ale tiež tlmia apoptózu navodzovanú chemoterapiou. Odlišný metabolizmus tak predstavuje potenciálny terapeutický cieľ a kombinácia štandardnej chemoterapie s inhibítormi niektorých metabolických enzýmov by mohla byť efektívna u rezistentných buniek, ktorých metabolizmus je odlišný od metabolizmu zdravých a tiež senzitívnych nádorových buniek (Zhao et al, 2013 review).

4.6.1. Rezistencia na glukokortikoidy v terapii ALL

Glukokortikoidy (GK) patria medzi steroidné hormóny produkované v kôre nadobličiek. Inhibujú metabolizmus glukózy v bunkách, zvyšujú glykémiiu a podporujú oxidáciu mastných kyselín. V medicíne sú využívané ako imunosupresíva a látky potlačujúce zápal (Buttgereit et al, 2015 review). Už desaťročia sa však používajú i v terapii malígnych ochorení buniek lymfoidnej línie.

Včasná odpoveď na podávanie prednizolu je dôležité kritérium pre určovanie prognózy pacientov s ALL liečených podľa BFM (Berlín – Frankfurt – Mníchov) protokolu (Starý, 2010 review; Starý et al, 2014). Momentálne sa v terapii ALL používajú syntetické glukokortikoidy prednizon (ktorý je metabolizovaný na aktívnu formu prednizolon) a dexametazon. GK sú hydrofóbne látky, ktoré prestupujú cez plazmatickú membránu buniek a viažu sa na glukokortikoidový receptor (GR). GR je asociovaný so chaperónmi (Cadepond et al, 1991), ktoré sa po naviazaní GK na GR uvoľnia. Fosforylovaný komplex GK-GR je následne translokovaný do jadra, kde pôsobí ako transkripčný faktor. Hlavným účinkom GK na bunky s ALL je navodenie apoptózy viacerými mechanizmami. Na jednej strane GK zvyšujú expresiu proapoptotického proteínu Bim, ktorý následne aktivuje vnútornú apoptotickú dráhu (Wang et al, 2003). Umlčanie génu kódujúceho Bim proteín vyvolá rezistenciu buniek na proapoptotické účinky GK (Spokoini et al, 2010). Podávanie GK je spojené tiež so znížením aktivity glykolytickej dráhy a tento efekt koreluje s mierou apoptózy. Podanie dimetylsukcinátu, substrátu pre enzýmy TCA, zabránil apoptóze po podaní GK u 40 % buniek senzitívnych na GK. Dá sa teda usudzovať, že apoptóza je čiastočne navodená inhibíciou glykolýzy u senzitívnych buniek (Buentke et al, 2011). V bunkách CLL dochádza po podaní dexametazonu k zníženiu metabolickej aktivity. V bunkách sú znížené hladiny intermediárnych produktov glykolýzy a glutamátu a zvýšené hladiny acetátu, čo naznačuje inhibíciu glykolýzy a glutaminolýzy a naopak stimuláciu FAO (Tung et al, 2013). Porovnanie profilu génovej expresie senzitívnych a rezistentných T-ALL buniek preukázalo výrazne anabolický metabolizmus u rezistentných buniek, demonštrovaný zvýšenou expresiou génov kódujúcich enzýmy glykolýzy, komplex dýchacieho reťazca, syntézy cholesterolu a steroidov, metabolizmu glutamátu a enzýmy antioxidantného systému (Beesley et al, 2009). Zásadný význam zvýšenej aktivity glykolytickej dráhy v rezistentných bunkách dokazuje obnovenie citlivosti na GK u rezistentných buniek, kultivovaných v prítomnosti 2-DG (Hulleman et al, 2009; Samuels et al, 2013). Inhibícia expresie génu kódujúceho glykolytický enzým GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza) vedie k apoptóze rezistentných buniek, efekt je porovnateľný s podávaním 2-DG. Podobný efekt ako 2-DG majú inhibítory glykolýzy 3-BrP (3-bromopyruvát) a lonidamil. Podávanie inhibítorov glykolýzy spolu s GK by mohlo predstavovať spôsob terapie pacientov s ALL rezistentných na terapiu GK (Hulleman et al, 2009).

5. Záver

Metabolizmus nádorových buniek sa odlišuje od metabolizmu zdravých buniek v mnohých aspektoch. Od dvadsiatych rokov minulého storočia, kedy bola Ottom Warburgom popísaná aeróbna glykolýza, až do súčasnosti boli u nádorových buniek objavené zmeny v metabolizme glukózy, odlišnosti v citrátovom cykle, metabolizme lipidov aj aminokyselín. Spoločným znakom týchto zmien je zvýšená aktivita anabolických dráh, podporujúca proliferáciu nádorových buniek. Limitujúcim zdrojom pre rýchlo proliferujúce bunky zrejme nie je ATP, ale dostatok redukovanej formy uhlíka a dusíka. Väčšia pozornosť bola v doterajšom výskume venovaná solídnym nádorom, niektoré odlišnosti v metabolizme však boli popísané aj u leukemických buniek. Poznatky o metabolických odlišnostiach nádorových buniek by mohli nájsť využitie predovšetkým v terapii leukemických pacientov, u ktorých sa objaví rezistencia na liečbu. Doterajšie výsledky naznačujú, že podávanie inhibítorov vybraných metabolických enzýmov súčasne so štandardnou liečbou vedie k zvýšeniu senzitivity u rezistentných buniek a v budúcnosti by mohlo stať súčasťou cielenej terapie leukemických pacientov. Zároveň to znamená nutnosť ďalšieho výskumu v oblasti metabolizmu senzitívnych a rezistentných leukemických buniek, nakoľko takáto terapia je možná len v prípade, že je známy metabolický profil oboch typov buniek a na základe tohto porovnania je možné nájsť citlivé miesto v metabolizme rezistentných buniek.

Táto bakalárska práca popisuje zmeny v metabolizme nádorových buniek a uvádza konkrétne príklady potenciálnej terapie. Vzhľadom k množstvu poznatkov v tejto oblasti nie je v rozsahu tejto práce možné podrobne popísať jednotlivé dráhy a ich význam v terapii. Pozornosť je preto venovaná najmä akútnej leukémii, ktorá patrí k najčastejším malígnym ochoreniam v detskom veku.

Výzvou v tejto oblasti onkologického výskumu je komplexnosť a čiastočná redundancia jednotlivých metabolických dráh. Do interakcie signálnych a metabolických dráh navyše vstupuje konkrétny chemoterapeutický agens, ktorého účinok sa môže líšiť podľa dávky. Veľký prínos bude v budúcnosti zrejme predstavovať štruktúrna biológia a bioinformatika, ktoré by mohli umožniť tvorbu podrobných metabolických profilov jednotlivých subtypov nádorov a hľadanie nízkomolekulárnych inhibítorov metabolických enzýmov. Jedným z možných prístupov by bolo vytvorenie databázy metabolických profilov, podobnej databázam povrchových markerov buniek, a prípadné využitie tejto databázy pri navrhovaní nízkomolekulárnych inhibítorov kľúčových metabolických enzýmov.

6. Zoznam použitej literatúry

- 1.*ⁱ Ali, U. *et al.* L-asparaginase as a critical component to combat Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL): A novel approach to target ALL. *European Journal of Pharmacology* **771**, 199–210 (2016).
2. Bals, J. *et al.* Pretreatment d-2-hydroxyglutarate serum levels negatively impact on outcome in IDH1-mutated acute myeloid leukemia. *Leukemia* (2015). doi:10.1038/leu.2015.317
3. Bauer, D. E., Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Andreadis, C. & Thompson, C. B. ATP citrate lyase is an important component of cell growth and transformation. *Oncogene* **24**, 6314–6322 (2005).
4. Baysal, B. E. *et al.* Mutations in SDHD, a Mitochondrial Complex II Gene, in Hereditary Paraganglioma. *Science* **287**, 848–851 (2000).
5. Beesley, A. H. *et al.* Glucocorticoid resistance in T-lineage acute lymphoblastic leukaemia is associated with a proliferative metabolism. *Br J Cancer* **100**, 1926–1936 (2009).
6. Berra, E. *et al.* HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *EMBO J* **22**, 4082–4090 (2003).
7. Birner, P. *et al.* Mutant IDH1 inhibits PI3K/Akt signaling in human glioma. *Cancer* **120**, 2440–2447 (2014).
8. Brand, K. Glutamine and glucose metabolism during thymocyte proliferation. Pathways of glutamine and glutamate metabolism. *Biochem J* **228**, 353–361 (1985).
- 9.* Brand, M. D. & Esteves, T. C. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab.* **2**, 85–93 (2005).
10. Broome, J. D. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effect. *J Exp Med* **118**, 99–120 (1963).
11. Bruick, R. K. & McKnight, S. L. A Conserved Family of Prolyl-4-Hydroxylases That Modify HIF. *Science* **294**, 1337–1340 (2001).
12. Buentke, E. *et al.* Glucocorticoid-induced cell death is mediated through reduced glucose metabolism in lymphoid leukemia cells. *Blood Cancer J* **1**, e31 (2011).
- 13.* Buttgereit, F., Spies, C. M. & Bijlsma, J. W. J. Novel glucocorticoids: where are we now and where do we want to go? *Clin. Exp. Rheumatol.* **33**, S29-33 (2015).
14. Cadepond, F. *et al.* Heat shock protein 90 as a critical factor in maintaining

- glucocorticosteroid receptor in a nonfunctional state. *J. Biol. Chem.* **266**, 5834–5841 (1991).
15. Cao, X. *et al.* Glucose uptake inhibitor sensitizes cancer cells to daunorubicin and overcomes drug resistance in hypoxia. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **59**, 495–505 (2007).
 - 16.* Carracedo, A., Cantley, L. C. & Pandolfi, P. P. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nature Reviews Cancer* **13**, 227–232 (2013).
 17. Carracedo, A. *et al.* A metabolic prosurvival role for PML in breast cancer. *J Clin Invest* **122**, 3088–3100 (2012).
 18. Cavalli, L. R., Varella-Garcia, M. & Liang, B. C. Diminished tumorigenic phenotype after depletion of mitochondrial DNA. *Cell Growth & Differentiation* **8**, 1189 (1997).
 19. Clem, B. *et al.* Small-molecule inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase activity suppresses glycolytic flux and tumor growth. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 110–120 (2008).
 20. Cooper, S. L. & Brown, P. A. Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr Clin North Am* **62**, 61–73 (2015).
 21. Dang, L. *et al.* Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* **462**, 739 (2009).
 22. Datema, R. & Schwarz, R. T. Interference with glycosylation of glycoproteins. Inhibition of formation of lipid-linked oligosaccharides in vivo. *Biochem J* **184**, 113–123 (1979).
 23. David, C. J., Chen, M., Assanah, M., Canoll, P. & Manley, J. L. HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature* **463**, 364–368 (2010).
 24. DeBerardinis, R. J. *et al.* Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19345–19350 (2007).
 25. Delhommeau, F. *et al.* Mutation in TET2 in Myeloid Cancers. *New England Journal of Medicine* **360**, 2289–2301 (2009).
 26. Derdak, Z. *et al.* The mitochondrial uncoupling protein-2 promotes chemoresistance in cancer cells. *Cancer Res* **68**, 2813–2819 (2008).
 27. DeSalvo, J. *et al.* Inhibition of Akt Potentiates 2-DG–Induced Apoptosis via Downregulation of UPR in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mol Cancer Res* **10**, 969–978 (2012).

28. DiNardo, C. D. *et al.* Serum 2-hydroxyglutarate levels predict isocitrate dehydrogenase mutations and clinical outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* **121**, 4917–4924 (2013).
29. Durán, R. V. *et al.* Glutaminolysis Activates Rag-mTORC1 Signaling. *Molecular Cell* **47**, 349–358 (2012).
30. Eberhart, K. *et al.* Low doses of 2-deoxy-glucose sensitize acute lymphoblastic leukemia cells to glucocorticoid-induced apoptosis. *Leukemia* **23**, 2167–2170 (2009).
31. Ehsanipour, E. A. *et al.* Adipocytes Cause Leukemia Cell Resistance to L-Asparaginase via Release of Glutamine. *Cancer Res* **73**, 2998–3006 (2013).
32. Emadi, A. *et al.* Presence of isocitrate dehydrogenase mutations may predict clinical response to hypomethylating agents in patients with acute myeloid leukemia. *Am. J. Hematol.* **90**, E77–E79 (2015).
33. Emadi, A. *et al.* Inhibition of glutaminase selectively suppresses the growth of primary acute myeloid leukemia cells with IDH mutations. *Experimental Hematology* **42**, 247–251 (2014).
- 34.* Estey, E. H. Acute myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am. J. Hematol.* **87**, 89–99 (2012).
35. Evans, J. M. M., Donnelly, L. A., Emslie-Smith, A. M., Alessi, D. R. & Morris, A. D. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* **330**, 1304–1305 (2005).
36. Fantin, V. R., St-Pierre, J. & Leder, P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* **9**, 425–434 (2006).
37. Feng, J.-H. *et al.* Prognostic significance of IDH1 mutations in acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *American Journal of Blood Research* **2**, 254 (2012).
38. Figueroa, M. E. *et al.* Leukemic IDH1 and IDH2 Mutations Result in a Hypermethylation Phenotype, Disrupt TET2 Function, and Impair Hematopoietic Differentiation. *Cancer Cell* **18**, 553–567 (2010).
39. Figueroa, M. E. *et al.* DNA Methylation Signatures Identify Biologically Distinct Subtypes in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* **17**, 13–27 (2010).
40. Firth, J. D., Ebert, B. L. & Ratcliffe, P. J. Hypoxic Regulation of Lactate Dehydrogenase A Interaction between Hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *J. Biol. Chem.* **270**, 21021–21027 (1995).

41. Forman, B. M., Chen, J. & Evans, R. M. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ . *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4312–4317 (1997).
42. Gimm, O., Armanios, M., Dziema, H., Neumann, H. P. H. & Eng, C. Somatic and Occult Germ-line Mutations in SDHD, a Mitochondrial Complex II Gene, in Nonfamilial Pheochromocytoma. *Cancer Res* **60**, 6822–6825 (2000).
43. Gottlieb, E., Armour, S. M., Harris, M. H. & Thompson, C. B. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. *Cell Death Differ* **10**, 709–717 (2003).
44. Green, C. L. *et al.* The prognostic significance of IDH1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia is dependent on FLT3/ITD status. *Blood* **116**, 2779–2782 (2010).
45. Green, C. L. *et al.* The prognostic significance of IDH2 mutations in AML depends on the location of the mutation. *Blood* **118**, 409–412 (2011).
46. Gross, S. *et al.* Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *Journal of Experimental Medicine* **207**, 339–344 (2010).
47. Hara, K. *et al.* Amino Acid Sufficiency and mTOR Regulate p70 S6 Kinase and eIF-4E BP1 through a Common Effector Mechanism. *J. Biol. Chem.* **273**, 14484–14494 (1998).
- 48.* Hardie, D. G., Carling, D. & Carlson, M. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: Metabolic Sensors of the Eukaryotic Cell? *Annual Review of Biochemistry* **67**, 821 (1998).
49. Haupt, S. *et al.* Loss of PML cooperates with mutant p53 to drive more aggressive cancers in a gender-dependent manner. *Cell Cycle* **12**, 1722–1731 (2013).
50. Hermanova, I. *et al.* Pharmacological inhibition of fatty-acid oxidation synergistically enhances the effect of l-asparaginase in childhood ALL cells. *Leukemia* **30**, 209–218 (2016).
51. Hermanova, I., Zaliova, M., Trka, J. & Starkova, J. Low expression of asparagine synthetase in lymphoid blasts precludes its role in sensitivity to L-asparaginase. *Experimental Hematology* **40**, 657–665 (2012).
52. Huang, L. E., Gu, J., Schau, M. & Bunn, H. F. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7987–7992 (1998).
53. Huang, Y. *et al.* The Behaviour of 5-Hydroxymethylcytosine in Bisulfite

- Sequencing. *PLOS ONE* **5**, e8888 (2010).
54. Hulleman, E. *et al.* Inhibition of glycolysis modulates prednisolone resistance in acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* **113**, 2014–2021 (2009).
 55. Chaturvedi, A. *et al.* Mutant IDH1 promotes leukemogenesis in vivo and can be specifically targeted in human AML. *Blood* **122**, 2877–2887 (2013).
 56. Chesnelong, C. *et al.* Lactate dehydrogenase A silencing in IDH mutant gliomas. *Neuro Oncol* **16**, 686–695 (2014).
 57. Chesney, J. *et al.* Fructose-2,6-bisphosphate synthesis by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 (PFKFB4) is required for the glycolytic response to hypoxia and tumor growth. *Oncotarget* **5**, 6670–6686 (2014).
 58. Inoki, K., Li, Y., Xu, T. & Guan, K.-L. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev.* **17**, 1829–1834 (2003).
 59. Ito, S. *et al.* Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES cell self-renewal, and ICM specification. *Nature* **466**, 1129–1133 (2010).
 60. Jacque, N. *et al.* Targeting glutaminolysis has antileukemic activity in acute myeloid leukemia and synergizes with BCL-2 inhibition. *Blood* **126**, 1346–1356 (2015).
 61. Janes, M. R. *et al.* Effective and selective targeting of Ph⁺ leukemia cells using a TORC1/2 kinase inhibitor. *Nat Med* **16**, 205–213 (2010).
 62. Katić, K. B. Comparison of glycolytic enzyme and isoenzyme activity in breast cancers and dysplasia. *Med. Pregl.* **65**, 200–205 (2012).
 63. Katzen, H. M. & Schimke, R. T. Multiple forms of hexokinase in the rat: tissue distribution, age dependency, and properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **54**, 1218–1225 (1965).
 64. Kharas, M. G. *et al.* Constitutively active AKT depletes hematopoietic stem cells and induces leukemia in mice. *Blood* **115**, 1406–1415 (2010).
 65. Kolev, Y., Uetake, H., Takagi, Y. & Sugihara, K. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) expression in human gastric cancer: association with hypoxia-inducible factor (HIF-1 α) pathway, angiogenic factors production and poor prognosis. *Ann. Surg. Oncol.* **15**, 2336–2344 (2008).
 66. Krieg, A. F., Rosenblum, L. J. & Henry, J. B. Lactate Dehydrogenase Isoenzymes A Comparison of Pyruvate-to-Lactate and Lactate-to-Pyruvate Assays. *Clinical Chemistry* **13**, 196–203 (1967).
 67. Kurtoglu, M. *et al.* Under normoxia, 2-deoxy-D-glucose elicits cell death in select

- tumor types not by inhibition of glycolysis but by interfering with N-linked glycosylation. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 3049–3058 (2007).
68. Larrue, C. *et al.* Antileukemic Activity of 2-Deoxy-d-Glucose through Inhibition of N-Linked Glycosylation in Acute Myeloid Leukemia with FLT3-ITD or c-KIT Mutations. *Mol. Cancer Ther.* **14**, 2364–2373 (2015).
 69. Lengyel, E. *et al.* Metformin inhibits ovarian cancer growth and increases sensitivity to paclitaxel in mouse models. *Am J Obstet Gynecol* **212**, 479.e1-479.e10 (2015).
 - 70.* Levis, M. Targeting IDH: the next big thing in AML. *Blood* **122**, 2770–2771 (2013).
 71. Liu, T. *et al.* Glucose transporter 1-mediated glucose uptake is limiting for B-cell acute lymphoblastic leukemia anabolic metabolism and resistance to apoptosis. *Cell Death Dis* **5**, e1470 (2014).
 72. Liu, Y. *et al.* A Small-Molecule Inhibitor of Glucose Transporter 1 Downregulates Glycolysis, Induces Cell-Cycle Arrest, and Inhibits Cancer Cell Growth In Vitro and In Vivo. *Mol Cancer Ther* **11**, 1672–1682 (2012).
 73. Lorsbach, R. B. *et al.* TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;q23). *Leukemia* **17**, 637–641 (2003).
 74. Lu, C. *et al.* IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* **483**, 474–478 (2012).
 75. Maier, T., Jenni, S. & Ban, N. Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 Å resolution. *Science* **311**, 1258–1262 (2006).
 76. Mardis, E. R. *et al.* Recurring Mutations Found by Sequencing an Acute Myeloid Leukemia Genome. *New England Journal of Medicine* **361**, 1058–1066 (2009).
 77. Maschek, G. *et al.* 2-deoxy-D-glucose increases the efficacy of adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers in vivo. *Cancer Res.* **64**, 31–34 (2004).
 - 78.* Mazurek, S. Pyruvate kinase type M2: A key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **43**, 969–980 (2011).
 79. Melstrom, L. G. *et al.* Apigenin inhibits the GLUT-1 glucose transporter and the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in human pancreatic cancer cells. *Pancreas* **37**, 426–431 (2008).
 80. Milgraum, L. Z., Witters, L. A., Pasternack, G. R. & Kuhajda, F. P. Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in in situ breast carcinoma. *Clin*

- Cancer Res* **3**, 2115–2120 (1997).
81. Miwa, H. Leukemia cells demonstrate a different metabolic perturbation provoked by 2-deoxyglucose. *Oncology Reports* (2013). doi:10.3892/or.2013.2299
 - 82.* Moschetta, M., Reale, A., Marasco, C., Vacca, A. & Carratù, M. R. Therapeutic targeting of the mTOR-signalling pathway in cancer: benefits and limitations. *Br J Pharmacol* **171**, 3801–3813 (2014).
 83. Mulas, M. F. *et al.* Cholesterol esters as growth regulators of lymphocytic leukaemia cells. *Cell Proliferation* **44**, 360–371 (2011).
 84. Nicklin, P. *et al.* Bidirectional Transport of Amino Acids Regulates mTOR and Autophagy. *Cell* **136**, 521–534 (2009).
 85. Noguchi, Y. *et al.* Suppression of facilitative glucose transporter 1 mRNA can suppress tumor growth. *Cancer Letters* **154**, 175–182 (2000).
 86. Orita, H. *et al.* Selective inhibition of fatty acid synthase for lung cancer treatment. *Clin. Cancer Res.* **13**, 7139–7145 (2007).
 87. Overholtzer, M. *et al.* A Nonapoptotic Cell Death Process, Entosis, that Occurs by Cell-in-Cell Invasion. *Cell* **131**, 966–979 (2007).
 88. Palomero, T. *et al.* Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. *Nature Medicine* **13**, 1203–1210 (2007).
 - 89.* Parker, S. J. & Metallo, C. M. Metabolic consequences of oncogenic IDH mutations. *Pharmacology & Therapeutics* **152**, 54–62 (2015).
 90. Parmentier, J. H. *et al.* Glutaminase activity determines cytotoxicity of l-asparaginases on most leukemia cell lines. *Leukemia Research* **39**, 757–762 (2015).
 91. Parsons, D. W. *et al.* An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science* **321**, 1807 (2008).
 92. Pastorino, J. G., Shulga, N. & Hoek, J. B. Mitochondrial Binding of Hexokinase II Inhibits Bax-induced Cytochrome c Release and Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 7610–7618 (2002).
 - 93.* Pavlova, N. N. & Thompson, C. B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* **23**, 27–47 (2016).
 94. Pérez-Gómez, C. *et al.* Co-expression of glutaminase K and L isoenzymes in human tumour cells. *Biochem J* **386**, 535–542 (2005).
 95. Piyathilake, C. J. *et al.* The expression of fatty acid synthase (FASE) is an early

- event in the development and progression of squamous cell carcinoma of the lung. *Hum. Pathol.* **31**, 1068–1073 (2000).
96. Polet, F. *et al.* Reducing the serine availability complements the inhibition of the glutamine metabolism to block leukemia cell growth. *Oncotarget* **7**, 1765–1776 (2016).
 97. Pollard, P. J. *et al.* Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1 α in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 2231–2239 (2005).
 98. Raez, L. E. *et al.* A phase I dose-escalation trial of 2-deoxy-D-glucose alone or combined with docetaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **71**, 523–530 (2013).
 99. Ramya, L., Doble, M., Rekha, V. & Pulicherla, K. L-Asparaginase as Potent Anti-leukemic Agent and Its Significance of Having Reduced Glutaminase Side Activity for Better treatment of Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Applied Biochemistry & Biotechnology* **167**, 2144 (2012).
 100. Rastogi, S., Banerjee, S., Chellappan, S. & Simon, G. R. Glut-1 antibodies induce growth arrest and apoptosis in human cancer cell lines. *Cancer Lett.* **257**, 244–251 (2007).
 101. Regev, R. & Eytan, G. D. Flip-Flop of Doxorubicin across Erythrocyte and Lipid Membranes. *Biochemical Pharmacology* **54**, 1151–1158 (1997).
 102. Reitman, Z. J. *et al.* Profiling the effects of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations on the cellular metabolome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 3270–3275 (2011).
 103. Ricciardi, M. R. *et al.* Targeting the leukemia cell metabolism by the CPT1a inhibition: functional preclinical effects in leukemias. *Blood* **126**, 1925–1929 (2015).
 104. Rodríguez-Lirio, A. *et al.* Metformin Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Drug-Resistant Leukemia Cells. *Leuk Res Treatment* **2015**, (2015).
 105. Rosilio, C. *et al.* The metabolic perturbators metformin, phenformin and AICAR interfere with the growth and survival of murine PTEN-deficient T cell lymphomas and human T-ALL/T-LL cancer cells. *Cancer Letters* **336**, 114–126 (2013).
 106. Roumier, C. *et al.* Cooperation of activating Ras/rtk signal transduction pathway mutations and inactivating myeloid differentiation gene mutations in M0 AML: a study of 45 patients. *Leukemia (08876924)* **20**, 433–436 (2006).
 107. Rysman, E. *et al.* De novo Lipogenesis Protects Cancer Cells from Free Radicals

- and Chemotherapeutics by Promoting Membrane Lipid Saturation. *Cancer Res* **70**, 8117–8126 (2010).
108. Samudio, I., Fiegl, M., McQueen, T., Clise-Dwyer, K. & Andreeff, M. The Warburg effect in leukemia-stroma cocultures is mediated by mitochondrial uncoupling associated with uncoupling protein 2 activation. *Cancer Res* **68**, 5198–5205 (2008).
- 109.* Samudio, I., Fiegl, M. & Andreeff, M. Mitochondrial uncoupling and the Warburg effect: Molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism. *Cancer Res* **69**, (2009).
110. Samudio, I. *et al.* Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *J Clin Invest* **120**, 142–156 (2010).
111. Samuels, A. L., Heng, J. Y., Beesley, A. H. & Kees, U. R. Bioenergetic modulation overcomes glucocorticoid resistance in T-lineage acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **165**, 57–66 (2014).
112. Sancak, Y. *et al.* The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* **320**, 1496–1501 (2008).
113. Sanders, M. J., Grondin, P. O., Hegarty, B. D., Snowden, M. A. & Carling, D. Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J* **403**, 139–148 (2007).
114. Selak, M. A. *et al.* Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* **7**, 77–85 (2005).
115. Shaw, R. J. *et al.* The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3329–3335 (2004).
116. Schafer, Z. T. *et al.* Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment. *Nature* **461**, 109–113 (2009).
117. Schöneberg, T., Kloos, M., Brüser, A., Kirchberger, J. & Sträter, N. Structure and allosteric regulation of eukaryotic 6-phosphofructokinases. *Biological Chemistry* **394**, 977–993 (2013).
118. Sols, A. & Crane, R. K. Substrate Specificity of Brain Hexokinase. *J. Biol. Chem.* **210**, 581–595 (1954).
119. Song, K. *et al.* HIF-1 α and GLUT1 gene expression is associated with chemoresistance of acute myeloid leukemia. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **15**, 1823–1829 (2014).
120. Spokoini, R., Kfir-Erenfeld, S., Yefenof, E. & Sionov, R. V. Glycogen synthase

- kinase-3 plays a central role in mediating glucocorticoid-induced apoptosis. *Mol. Endocrinol.* **24**, 1136–1150 (2010).
121. Stary, J. *et al.* Intensive Chemotherapy for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Results of the Randomized Intercontinental Trial ALL IC-BFM 2002. *JCO* **32**, 174–184 (2014).
- 122.* Stary, J. Akutní leukémie u dětí. *Onkologie* **4**, 120–124 (2010).
- 123.* Stäubert, C. *et al.* Rewired Metabolism in Drug-resistant Leukemia Cells. *J Biol Chem* **290**, 8348–8359 (2015).
124. Stein, M. *et al.* Targeting tumor metabolism with 2-deoxyglucose in patients with castrate-resistant prostate cancer and advanced malignancies. *Prostate* **70**, 1388–1394 (2010).
125. Stuart, C. A., Howell, M. E. A., Zhang, Y. & Yin, D. Insulin-stimulated translocation of glucose transporter (GLUT) 12 parallels that of GLUT4 in normal muscle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **94**, 3535–3542 (2009).
126. Suganuma, K. *et al.* Energy metabolism of leukemia cells: glycolysis versus oxidative phosphorylation. *Leukemia & Lymphoma* **51**, 2112–2119 (2010).
127. Sugimoto, K. *et al.* A clinically attainable dose of L-asparaginase targets glutamine addiction in lymphoid cell lines. *Cancer Sci* **106**, 1534–1543 (2015).
128. Sun, Q. *et al.* Mammalian target of rapamycin up-regulation of pyruvate kinase isoenzyme type M2 is critical for aerobic glycolysis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 4129–4134 (2011).
129. Szeliga, M. *et al.* Silencing of GLS and overexpression of GLS2 genes cooperate in decreasing the proliferation and viability of glioblastoma cells. *Tumour Biol* **35**, 1855–1862 (2014).
130. Tahiliani, M. *et al.* Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science* **324**, 930–935 (2009).
131. Tanimoto, K., Makino, Y., Pereira, T. & Poellinger, L. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 α by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J* **19**, 4298–4309 (2000).
- 132.* Thorens, B. & Mueckler, M. Glucose transporters in the 21st Century. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **298**, E141-145 (2010).
133. Tong, W.-H. *et al.* The glycolytic shift in fumarate-hydratase-deficient kidney cancer lowers AMPK levels, increases anabolic propensities and lowers cellular iron levels. *Cancer Cell* **20**, 315–327 (2011).

134. Tsukada, Y. *et al.* Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* **439**, 811–816 (2006).
135. Tung, S. *et al.* PPAR α and fatty acid oxidation mediate glucocorticoid resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **122**, 969–980 (2013).
136. Vazquez-Martin, A., Colomer, R., Brunet, J., Lupu, R. & Menendez, J. A. Overexpression of fatty acid synthase gene activates HER1/HER2 tyrosine kinase receptors in human breast epithelial cells. *Cell Proliferation* **41**, 59–85 (2008).
137. Wang, F. *et al.* Targeted Inhibition of Mutant IDH2 in Leukemia Cells Induces Cellular Differentiation. *Science* 1–3 (2013). doi:10.1126/science.1234769
138. Wang, F. Separate and concurrent use of 2-deoxy-D-glucose and 3-bromopyruvate in pancreatic cancer cells. *Oncology Reports* (2012). doi:10.3892/or.2012.2085
139. Wang, H. *et al.* Inhibition of glycolytic enzyme hexokinase II (HK2) suppresses lung tumor growth. *Cancer Cell Int* **16**, (2016).
140. Wang, Y.-H. *et al.* Cell-state-specific metabolic dependency in hematopoiesis and leukemogenesis. *Cell* **158**, 1309–1323 (2014).
141. Wang, Z., Malone, M. H., He, H., McColl, K. S. & Distelhorst, C. W. Microarray Analysis Uncovers the Induction of the Proapoptotic BH3-only Protein Bim in Multiple Models of Glucocorticoid-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **278**, 23861–23867 (2003).
142. Warburg, O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* **124**, 269–270 (1956).
143. Ward, P. S. *et al.* Identification of additional IDH mutations associated with oncometabolite R(-)-2-hydroxyglutarate production. *Oncogene* **31**, 2491–2498 (2012).
- 144.* Ward, P. S. & Thompson, C. B. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. *Cancer Cell* **21**, 297–308 (2012).
145. Willems, L. *et al.* Inhibiting glutamine uptake represents an attractive new strategy for treating acute myeloid leukemia. *Blood* **122**, 3521–3532 (2013).
146. Wise, D. R. *et al.* Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 18782–18787 (2008).
- 147.* Wise, D. R. & Thompson, C. B. Glutamine Addiction: A New Therapeutic Target in Cancer. *Trends Biochem Sci* **35**, 427–433 (2010).

148. Wittwer, J. A. *et al.* Enhancing Mitochondrial Respiration Suppresses Tumor Promoter TPA-Induced PKM2 Expression and Cell Transformation in Skin Epidermal JB6 Cells. *Cancer Prev Res* **4**, 1476–1484 (2011).
149. Xie, J., Dai, C. & Hu, X. Evidence that does not support PKM2-catalyzed reaction as a rate-limiting step in cancer cell glycolysis. *J. Biol. Chem.* jbc.M115.704825 (2016). doi:10.1074/jbc.M115.704825
150. Xu, T. *et al.* Effects of Metformin on Metabolite Profiles and LDL Cholesterol in Patients With Type 2 Diabetes. *Dia Care* **38**, 1858–1867 (2015).
151. Xu, W. *et al.* Oncometabolite 2-Hydroxyglutarate Is a Competitive Inhibitor of α -Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases. *Cancer Cell* **19**, 17–30 (2011).
152. Xu, Y. *et al.* Genome-wide Regulation of 5hmC, 5mC, and Gene Expression by Tet1 Hydroxylase in Mouse Embryonic Stem Cells. *Molecular Cell* **42**, 451–464 (2011).
- 153.* Yadav, N. & Chandra, D. Mitochondrial and Postmitochondrial Survival Signaling in Cancer. *Mitochondrion* **0**, 18–25 (2014).
154. Yamaguchi, H. & Wang, H.-G. CHOP Is Involved in Endoplasmic Reticulum Stress-induced Apoptosis by Enhancing DR5 Expression in Human Carcinoma Cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 45495–45502 (2004).
155. Yamaguchi, S. *et al.* IDH1 and IDH2 mutations confer an adverse effect in patients with acute myeloid leukemia lacking the NPM1 mutation. *Eur J Haematol* **92**, 471–477 (2014).
156. Yue, S. *et al.* Cholesteryl Ester Accumulation Induced by PTEN Loss and PI3K/AKT Activation Underlies Human Prostate Cancer Aggressiveness. *Cell Metab* **19**, 393–406 (2014).
157. Yuneva, M., Zamboni, N., Oefner, P., Sachidanandam, R. & Lazebnik, Y. Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *J Cell Biol* **178**, 93–105 (2007).
158. Zawacka-Pankau, J. *et al.* Inhibition of Glycolytic Enzymes Mediated by Pharmacologically Activated p53. *J Biol Chem* **286**, 41600–41615 (2011).
159. Zha, X. *et al.* TSC1/TSC2 inactivation inhibits AKT through mTORC1-dependent up-regulation of STAT3-PTEN cascade. *Cancer Letters* **313**, 211–217 (2011).
160. Zhang, T.-B., Zhao, Y., Tong, Z.-X. & Guan, Y.-F. Inhibition of glucose-transporter 1 (GLUT-1) expression reversed Warburg effect in gastric cancer cell MKN45. *Int J Clin Exp Med* **8**, 2423–2428 (2015).
161. Zhao, S. *et al.* Glioma-Derived Mutations in IDH1 Dominantly Inhibit IDH1

Catalytic Activity and Induce HIF-1 α . *Science* **324**, 261–265 (2009).

- 162.* Zhao, Y., Butler, E. B. & Tan, M. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell Death Dis* **4**, e532 (2013).
163. Zhuo, B. *et al.* PI3K/Akt signaling mediated Hexokinase-2 expression inhibits cell apoptosis and promotes tumor growth in pediatric osteosarcoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **464**, 401–406 (2015).

Monografie:

Marta Mellai, Valentina Caldera, Laura Annovazzi and Davide Schiffer (2013). The Distribution and Significance of IDH Mutations in Gliomas, Evolution of the Molecular Biology of Brain Tumors and the Therapeutic Implications, Dr. Terry Lichtor (Ed.), InTech. ([online], [vid. 8.5.2013], Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/evolution-of-the-molecular-biology-of-brain-tumors-and-the-therapeutic-implications/the-distribution-and-significance-of-idh-mutations-in-gliomas>)

ⁱ Znak „*“ označuje v Zozname použitej literatúry prehľadový článok (review).