

Wpływ hipoksji na zmiany metabolizmu komórek nowotworowych

Katarzyna Błaszczak-Świątkiewicz, Paulina Olszewska, Elżbieta Mikiciuk-Olasik

Cechą charakterystyczną guzów litych jest ich niedotlenienie, które istotnie wpływa na biologię nowotworu oraz odpowiedź na standardowe schematy leczenia (chemioterapię i radioterapię), co w konsekwencji decyduje o stopniu zaawansowania choroby nowotworowej pacjentów. Odpowiedź adaptacyjna komórek nowotworowych do warunków hipoksji jest związana ze stymulacją angiogenezy i erytropoezy oraz zmianą metabolizmu komórek guza. W komórkach nowotworowych następuje przestrojenie metabolizmu, które prowadzi do wzrostu glikolizy, zahamowania fosforylacji oksydacyjnej i zwiększenia syntezy kwasów tłuszczowych *de novo*. Niedotlenienie powoduje aktywację czynnika transkrypcyjnego HIF-1, który odgrywa kluczową rolę w przeprogramowaniu metabolizmu komórek nowotworowych poprzez aktywację transkrypcji genów kodujących transportery glukozy i enzymy glikolityczne, co umożliwia zwiększenie glikolizy. Ponadto HIF-1 aktywuje kinazę dehydrogenazy pirogronianowej 1 (*pyruvate dehydrogenase kinase 1*, PDK1), która powoduje zmniejszenie oddychania mitochondrialnego. Przesunięcie oksydacyjnego metabolizmu w stronę glikolizy beztlenowej pozwala na utrzymanie homeostazy redoks i umożliwia przeżycie oraz proliferację komórek nowotworowych w warunkach niedotlenienia.

Effects of hypoxia on tumor metabolism

A major feature of solid tumors is hypoxia which affects cancer biology, increases resistance to treatment and patient prognosis. Adaptive responses of cells to hypoxia include stimulation of angiogenesis, erythropoiesis and alteration of cellular metabolism. Cancer cells are characterized by reprogramming of metabolism leading to increased glycolysis, attenuation of oxidative phosphorylation and *de novo* synthesis of fatty acids. Hypoxia-induced activation of hypoxia-inducible factor (HIF-1) plays an important role in the reprogramming of cancer metabolism by activating transcription of genes encoding glucose transporters and glycolytic enzymes leading to increased glucose uptake, and pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1), which diminished mitochondrial respiration. The shift from oxidative to glycolytic metabolism allows maintenance of redox homeostasis, survival and continued proliferation of cancer cells under hypoxic conditions.

NOWOTWORY Journal of Oncology 2012; 62, 4: 283–290

Słowa kluczowe: niedotlenienie, nowotwór, metabolizm komórek

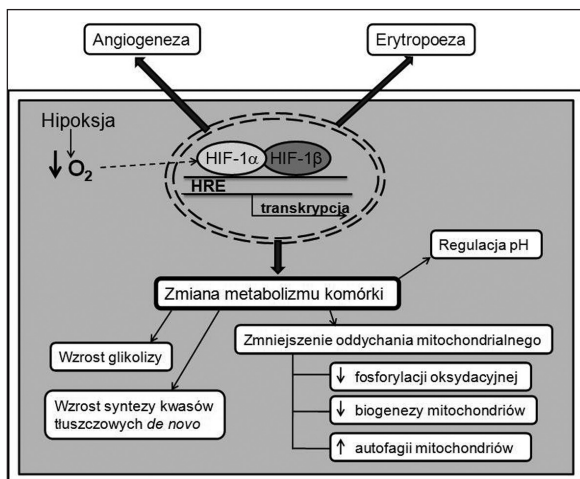
Key words: hypoxia, cancer, cell metabolism

Praca finansowana przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi (53–3015–1, grant nr 507 13 052)

Wstęp

Mikrośrodowisko guzów litych charakteryzuje się hipoksją, niskim pH (kwasicą) oraz ograniczoną podażą składników odżywczych. Stany te są następstwem stosunkowo szybkiej proliferacji komórek nowotworowych oraz niewy-

starzającego i dysfunkcjonalnego unaczynienia guza [1]. W komórkach tych zależność produkcji energii od tlenu wymaga efektywnej adaptacji komórek nowotworowych do warunków niedotlenienia. Najważniejszym aspektem



Rycina 1. Odpowiedź adaptacyjna komórek nowotworowych na hipoksję

HIF-1 α — podjednostka α czynnika HIF-1; HIF-1 β — podjednostka β czynnika HIF-1; HRE — element odpowiedzi na hipoksję

komórkowej odpowiedzi na hipoksję jest stymulacja angiogenezy i erytropoezy oraz przestrojenie metabolizmu na beztlenowy [2, 3]. Zmiana metabolizmu komórek nowotworowych jest kluczową odpowiedzią adaptacyjną na niedotlenienie, która charakteryzuje się wzrostem transportu glukozy do komórek i zwiększeniem procesu glikolizy, czego wynikiem jest podwyższona produkcja mleczanu. Proces glikolizy jest głównym źródłem pozyskiwania energii (ATP) w warunkach hipoksji w wyniku zahamowania fosforylacji oksydacyjnej [4] i zmniejszenia liczby mitochondriów w komórkach [5]. Ponadto hipoksja wpływa na zmianę metabolizmu lipidów, powodując wzrost syntezy kwasów tłuszczowych *de novo* w wyniku zwiększenia ekspresji enzymów lipogenezy (ryc. 1). Nasilenie procesu glikolizy w komórkach nowotworowych pozwala na zwiększenie liczby metabolicznych prekursorów niezbędnych do syntezy kwasów nukleinowych, białek i fosfolipidów, co umożliwia proliferację komórek [6].

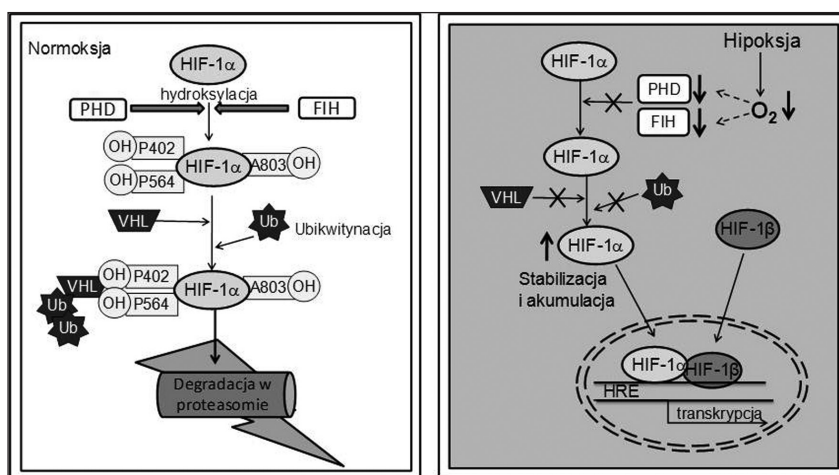
Niedotlenienie komórek nowotworowych powoduje aktywację czynnika transkrypcyjnego HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*, HIF-1). HIF-1 odgrywa kluczową rolę w przeprogramowaniu metabolizmu komórek nowotworowych poprzez aktywację transkrypcji genów kodujących transportery glukozy i genów kodujących enzymy glikolityczne. Aktywacja HIF-1 powoduje również zmniejszenie oddychania mitochondrialnego poprzez zwiększenie ekspresji PDK1 (*pyruvate dehydrogenase kinase 1*) oraz indukcję autofagii mitochondriów zależnej od białka BNIP3 (*BCL2/adenovirus E1B 19kDa protein-interacting protein 3*) [7]. HIF-1 reguluje także równowagę między zużyciem tlenu, a produkcją ATP i toksycznych reaktywnych form tlenu (*reactive oxygen species*, ROS) w odpowiedzi na hipoksję [7]. Przeprogramowanie oksydacyjnego metabolizmu w kierunku glikolizy beztlenowej przyczynia się do przeżycia oraz umożliwia proliferację

komórek nowotworowym w warunkach niedotlenienia [8]. Zahamowanie adaptacyjnych odpowiedzi na hipoksję prowadzi do śmierci komórek w wyniku tworzenia toksycznych ROS [9]. Nowe osiągnięcia w badaniach naukowych na temat zmian metabolizmu komórek nowotworowych mają istotne znaczenie kliniczne, ponieważ są one wykorzystywane w diagnostyce guzów, służą jako markery prognostyczne oraz są przedmiotem badań w celowanej terapii przeciwnowotworowej.

HIF-1 jako kluczowy czynnik w odpowiedzi adaptacyjnej komórek na hipoksję

Zmniejszenie podaży tlenu w komórkach powoduje aktywację czynnika transkrypcyjnego HIF-1, który reguluje transkrypcję setek genów kodujących białka biorące udział w różnych aspektach biologii nowotworów, między innymi w nieśmiertelności komórek, angiogenezie, metabolizmie, niestabilności genetycznej, inwazji, przerzutach, transdukcji sygnału dla czynników wzrostu oraz oporności na chemioterapię i radioterapię [10–13]. HIF-1 funkcjonuje jako heterodimer składający się z podjednostki HIF-1 α i HIF-1 β [14]. Poziom podjednostki HIF-1 α związany jest ze stopniem zawartości tlenu w komórkach i w czasie hipoksji gwałtownie wzrasta, natomiast ekspresja podjednostki HIF-1 β jest konstytutywnie stabilna i niezależna od stężenia tlenu w komórce [4, 15]. W utlenianych komórkach HIF-1 jest nieaktywny, ponieważ jego podjednostka HIF-1 α jest degradowana [16]. W warunkach tlenowych HIF-1 α ulega hydroksylacji na prolinie 402 i 564 za pomocą hydroksylazy prolinowej (*prolyl hydroxylase*, PHD) [17]. Następnie hydroksylowany HIF-1 α łączy się z białkiem VHL (*von Hippel-Lindau tumor suppressor protein*, VHL) i ubikwityną przy udziale ligazy ubikwityny E3 co powoduje degradację kompleksu w proteasomie [4, 18, 19]. Oprócz reszt proliny hydroksylacji ulega też asparagina 803 przy udziale czynnika FIH (*factor inhibiting HIF-1*, FIH) [7, 17]. W warunkach hipoksji hydroksylacja HIF-1 α jest zahamowana w wyniku inaktywacji enzymów PHD i FIH, których aktywność jest zależna od stężenia tlenu [4]. Prowadzi to do stabilizacji i akumulacji podjednostki HIF-1 α , która przemieszcza się do jądra komórki. W jądrze HIF-1 α łączy się z HIF-1 β , tworząc heterodimer, który wiąże się z elementem odpowiedzi na hipoksję HRE (*hypoxia response element*, HRE) i zapoczątkowuje transkrypcję docelowych genów [12], (ryc. 2).

Trzeba zaznaczyć, że aktywacja HIF-1 w komórkach nowotworowych może być niezależna od hipoksji w wyniku aktywacji onkogenów (*Ras*, *Src*, *PI3K*) lub utraty funkcji genów supresorowych (*vHL*, *PTEN*) [20]. HIF-1 jest kluczowym czynnikiem, który przyczynia się do zmiany metabolizmu komórek nowotworowych w warunkach niedotlenienia poprzez transkrypcję genów kodujących białka, które regulują glikolizę, oddychanie mitochondrialne, wewnątrzkomórkowe pH, produkcję ROS oraz lipogenezę [7].



Rycina 2. Mechanizm degradacji HIF-1 w proteasomie w warunkach tlenowych oraz aktywacji HIF-1 w warunkach hipoksji

P402 — prolina 402; P564 — prolina 564; PHD — hydroksylaza prolinowa; A803 — asparagina 803; HIF-1 — czynnik transkrypcyjny aktywowany niedotlenieniem; FIH — czynnik hamujący HIF-1; VHL — białko von Hippel-Lindau; Ub — ubiquityna; HIF-1 α — podjednostka α czynnika HIF-1; HIF-1 β — podjednostka β czynnika HIF-1; HRE — element odpowiedzi na hipoksję

Wpływ hipoksji na glikolizę w komórkach nowotworowych

Prawidłowo zróżnicowane komórki produkują energię (ATP) głównie w wyniku mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej [6]. Zależność produkcji energii komórkowej od tlenu w procesie fosforylacji oksydacyjnej wymaga efektywnej adaptacji komórek do hipoksji. Niedotlenienie nowotworu powoduje przesunięcie oksydacyjnego metabolizmu w stronę glikolizy w wyniku stłumienia oddychania mitochondrialnego. Komórki nowotworowe charakteryzują się zwiększonym zapotrzebowaniem na glukozę i wysokim tempem procesu glikolizy [1]. Zależność komórek nowotworowych od produkcji energii w wyniku procesu beztlenowej glikolizy powoduje, że komórki pobierają znacznie więcej glukozy jako wynik małej efektywności glikolizy w generowaniu ATP w porównaniu do fosforylacji oksydacyjnej [6, 21]. Te istotne zmiany w metabolizmie glukozy komórek guza były po raz pierwszy zauważone przez Otto Warburga 80 lat temu. Warburg zakładał, że te przemiany są wynikiem uszkodzenia mitochondrialnych procesów oddechowych w komórkach nowotworowych [22]. W komórkach nowotworowych glukoza jest głównie metabolizowana do mleczanu przy udziale dehydrogenazy mleczanowej LDHA, w wyniku czego powstają dwie cząsteczki ATP [23]. W reakcji powstania mleczanu odtworzony zostaje NAD⁺, istotny ko-faktor umożliwiający kontynuację glikolizy [4]. Zwiększony proces glikolizy w komórkach nowotworowych przyczynia się nie tylko do produkcji energii w warunkach hipoksji, ale odgrywa także ważną rolę w produkcji prekursorów do syntezy kwasów nukleinowych, aminokwasów i fosfolipidów potrzebnych do proliferacji komórek w warunkach ograniczonej podaży składników odżywczych [8]. Aktywacja HIF-1 w wyniku niedotlenienia przyczynia się do zmiany metabolizmu glukozy poprzez indukcję transkrypcji genów

biorących udział w transporcie glukozy do komórek [4, 18] oraz poprzez zwiększenie ekspresji enzymów glikolitycznych, co przyczynia się do nasilenia procesu glikolizy [1, 15].

Transportery glukozy GLUT-1 i GLUT-3

Transport glukozy do komórek odbywa się z udziałem specjalistycznych białek obecnych w błonie komórkowej, tzw. transporterów glukozy (*glucose transporter*, GLUT) zgrupowanych w trzy klasy [15, 24]. Klasa I zawiera dobrze poznane transportery glukozy GLUT 1-4. Do II klasy należy transporter fruktozy GLUT5 oraz słabo poznane GLUT7, GLUT9, GLUT11, natomiast w skład III klasy wchodzi GLUT6, 8, 10 i GLUT12 [24]. Ekspresja transporterów glukozy jest specyficzna tkankowo. HIF-1, aktywowany niedotlenieniem, stymuluje transkrypcję genów *SLC2A1* i *SLC2A3*, które kodują transportery glukozy 1 i 3 (GLUT1 i GLUT3) [25]. Zwiększona ekspresja GLUT1 i GLUT3 w komórkach nowotworowych przyczynia się do skutecznego wychwytu glukozy ze środowiska zewnętrznego przez komórki guza. Wzrost transportu glukozy do komórek umożliwia zwiększenie procesu glikolizy w celu produkcji ATP i metabolicznych prekursorów niezbędnych do proliferacji w warunkach niedotlenienia [1]. W błonach komórek raka płuc, jajnika oraz żołądka pojawia się ekspresja GLUT3, która nie jest obecna w prawidłowych tkankach tych narządów, natomiast podwyższona ekspresja GLUT1 występuje w wielu rakach np. w raku piersi, nerki, trzustki, wątroby, płuc, szyjki macicy, jajnika [24, 26].

Enzymy glikolityczne

Niedotlenienie guzów powoduje nasilenie procesu glikolizy poprzez zwiększenie ekspresji enzymów glikolitycznych, takich jak: heksokinaza (*heksokinase*, HK), fosfofruktokinaza 1 (*phosphofructokinase*, PFK1), kinaza pirogronianowa M2 (*pyruvate kinase type M2*, PKM2) oraz

dehydrogenaza mleczanowa (*lactate dehydrogenase A*, LDHA), indukowanych przez HIF-1 [1, 4, 15, 18]. Zarówno transkrypcja genów *HK1* jak i *HK2*, które kodują odpowiednio enzymy HK1 i HK2 mogą być indukowane przez HIF1. Jednak badania wykazały, że niedotlenienie powoduje głównie zwiększenie ekspresji HK2 [27]. HK jest to enzym zlokalizowany na zewnętrznej błonie mitochondrialnej i bierze udział w pierwszym etapie przemian glukozy do glukozy-6-fosforanu [28]. Jednym z kluczowych enzymów zaangażowanych w glikolizę jest kinaza pirogronianowa (*pyruvate kinase*, PK), która katalizuje przekształcenie fosfoenolpirogrotonianu (*phosphoenolpyruvate*, PEP) w pirogronian z wytworzeniem ATP. W zależności od funkcji pełnionych przez tkanki wyróżnia się cztery izoformy tego enzymu: izoforma PK-L występuje w wątrobie i nerkach, izoforma PK-R jest specyficzna dla erytrocytów, natomiast izoforma PKM1 występuje w mięśniach i mózgu [29]. W dzielących się komórkach, szczególnie w komórkach nowotworowych występuje izoenzym PKM2 [8, 30, 31]. Wpływ PKM2 na proces glikolizy zależy od tego, czy występuje w formie wysoce aktywnej, tetramerycznej, czy mniej aktywnej formie dimerycznej. W prawidłowych komórkach wszystkie izoenzymy PK występują w formie tetramerycznej, która wykazuje wysokie powinowactwo do PEP, powodując wytworzenie pirogronianu i ATP. W komórkach nowotworowych PKM2 występuje głównie w formie dimerycznej, a pozostałe specyficzne tkankowo izoenzymy PK zanikają [8]. Forma dimeryczna prowadzi do tworzenia puli fosfometabolitów, które kierowane są w procesy syntezy niezbędne dla proliferujących komórek nowotworowych. Przełączenie PKM2 między formą tetrameryczną a dimeryczną umożliwia przeżycie i proliferację komórek nowotworowych w środowisku z ograniczoną podażą tlenu i składników odżywczych [32]. Tegoroczne badania wykazały, że PKM2 reguluje metabolizm poprzez nowy mechanizm, mianowicie, PKM2 funkcjonuje również jako transkrypcyjny koaktywator dla HIF-1 w komórkach nowotworowych [33]. PKM2, łącząc się bezpośrednio z HIF-1, zwiększa jego przyłączanie się do DNA oraz rekrutację koaktywatora p300, co powoduje nasilenie transkrypcji genów indukowanych przez HIF-1. Interakcja PKM2 z HIF-1 jest możliwa dzięki hydroksylacji PKM2 (na prolinie 403 i 408) za pomocą hydroksylazy prolinowej 3 (*prolyl hydroxylase 3*, PHD3). Wykazano, że usunięcie genu *PHD3* zmniejsza ekspresję GLUT1, LDHA, PDK1 i w konsekwencji przyczynia się do obniżenia pobierania glukozy i produkcji mleczanu oraz wzrostu zużycia tlenu [33, 34]. Wiele badań pokazało, że forma dimeryczna PKM2 jest uwalniana z komórek nowotworowych do krwi pacjentów z rakiem nerki, trzustki, płuc, piersi lub kału u osób z guzami przewodu pokarmowego [32, 35–38]. Z tego względu PKM2 jest stosowana jako niespecyficzny marker nowotworowy w diagnozowaniu różnych nowotworów, szczególnie przewodu pokarmowego [39, 40]. W niedotlenionych komórkach nowotworowych wzrasta

również aktywność dehydrogenazy mleczanowej LDHA indukowanej przez HIF-1. W wyniku zwiększonej glikolizy i zahamowania oddychania mitochondrialnego dochodzi do akumulacji pirogronianu. LDHA katalizuje przekształcenie pirogronianu i NADH w mleczan i NAD⁺. Odtworzenie NAD⁺ jest niezbędne do dalszego kontynuowania glikolizy [41, 42]. Redukcja ekspresji LDHA zmniejsza transformację komórek i wyraźnie opóźnia formowanie się guza [41].

Regulacja pH w komórkach nowotworowych

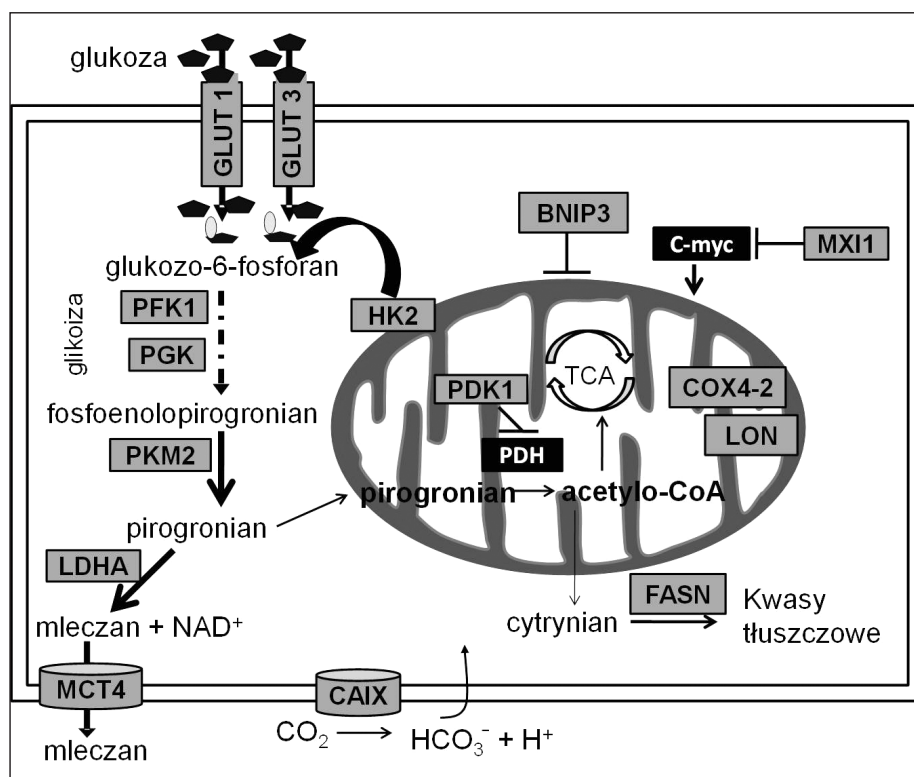
Zwiększona glikoliza i produkcja mleczanu w warunkach niedotlenienia powoduje kwasicę [43]. W komórkach nowotworowych glukoza jest metabolizowana głównie do mleczanu przy udziale LDHA, czego konsekwencją jest znaczne zmniejszenie wewnątrzkomórkowego pH [12]. Mleczan jest usuwany na zewnątrz komórki przy udziale specjalnego transportera MCT4 (*monocarboxylate transporter 4*, MCT4), którego ekspresja również jest zależna od aktywacji HIF-1 [44]. Znane są cztery rodziny transporterów MCT1-4, ale to głównie transporter czwarty ulega ekspresji w komórkach nowotworowych. Ponadto jednym z głównych enzymów biorących udział w regulacji homeostazy pH w komórkach jest anhidraza węglanowa (*carbonic anhydrase*, CA) [12, 45]. W odpowiedzi na niedotlenienie w komórkach nowotworowych dochodzi do zwiększonej ekspresji izoformy CAIX zależnej od aktywacji HIF-1 [46]. CAIX jest enzymem membranowym, który katalizuje odwracalną reakcję powstawania jonu wodorowęglanowego (HCO₃⁻) z wody i dwutlenku węgla. Jon HCO₃⁻ jest transportowany do wnętrza komórki, podczas gdy protony są pompowane do środowiska zewnętrznego. Ekspresja CAIX odgrywa kluczową rolę w zmniejszeniu kwasicy wewnątrzkomórkowej, dzięki czemu umożliwia przeżycie i wzrost komórek nowotworowych w warunkach hipoksji, natomiast kwasowe środowisko zewnętrzne może zwiększać ryzyko inwazji i metastazy komórek nowotworowych. Nadmierna ekspresja CAIX w nowotworach jest niekorzystnym czynnikiem rokującym dla pacjentów. Badania wykazały, że inhibicja CAIX powoduje śmierć komórek nowotworowych, w związku z tym zahamowanie aktywności enzymu stanowi dogodny cel terapii. Ponadto nadekspresja CAIX jest powszechnie stosowanym markerem prognostycznym w różnych ludzkich nowotworach [47, 48].

Wpływ niedotlenienia na oddychanie mitochondrialne

Hipoksja nie tylko stymuluje glikolizę w komórkach nowotworowych, ale także zmniejsza oddychanie mitochondrialne. Ostatnie badania sugerują aktywne wygaszanie mitochondrialnego cyklu Krebsa w niedotlenionych komórkach w sposób zależny od HIF-1 [45]. Czynnikiem HIF-1 bezpośrednio aktywuje enzym mitochondrialny, kinazę dehydrogenazy pirogronianowej (*pyruvate dehydrogenase kinase 1*,

PDK1), która inaktywuje dehydrogenazę pirogronianową (*pyruvate dehydrogenase*, PDH) przez fosforylację podjednostki E1α kompleksu enzymatycznego PDH [49, 50]. PDH, kluczowy regulator fosforylacji oksydacyjnej, przekształca pirogronian w acetylo-CoA, który jest niezbędnym metabolitem cyklu Krebsa. W wyniku inaktywacji PDH niedotlenione komórki mogą aktywnie przeprogramować swój metabolizm w kierunku glikolizy, co umożliwia utrzymanie stałej produkcji ATP [45]. Aktywacja PDK1 w warunkach niedotlenienia ma istotne znaczenie w osłabieniu fosforylacji oksydacyjnej, co zmniejsza zużycie tlenu i w konsekwencji ogranicza produkcję ROS [51]. Drugim mechanizmem zależnym od aktywacji HIF-1, który przyczynia się do zmniejszenia oddychania mitochondrialnego, jest regulacja liczby mitochondriów w komórce. HIF-1 hamuje kontrolowane przez białko *c-myc* (*cellular homologue to the transforming sequences of the avian myelocytomatosis retrovirus*, *c-myc*) powstawanie mitochondriów poprzez aktywację genu *MXI1* w warunkach niedotlenienia. Białko *MXI1* (*MAX-interacting protein 1*, *MXI1*) hamuje transkrypcyjną aktywność *c-myc* poprzez konkurowanie z białkiem *MAX*, które łączy się z *c-myc* i reguluje jego funkcję [52, 53]. Ponadto hipoksja także indukuje autofagię mitochondrialną w wielu

ludzkich komórkach nowotworowych poprzez aktywację *BNIP3* zależną od HIF-1 [5, 40]. Badania przeprowadzone na komórkach pozbawionych ekspresji HIF-1α pokazały, że mitochondrialna autofagia jest odpowiedzią adaptacyjną komórek na warunki przewlekłej hipoksji w celu podtrzymania żywotności komórek [40]. Wykazano, że komórki nieposiadające ekspresji HIF-1α lub *BNIP3* umierają w warunkach niedotlenienia w wyniku nadmiernej produkcji toksycznych ROS [40]. Trzecim mechanizmem, który kontroluje funkcje mitochondriów w warunkach niedotlenienia jest zmiana aktywności oksydazy cytochromu *c* (*cytochrome c oxidase*, *COX*). HIF-1 przyczynia się do optymalizacji zużycia tlenu w warunkach hipoksji poprzez aktywację podjednostki *COX4-2* oksydazy cytochromu *c*, należącej do kompleksu IV łańcucha oddechowego [54]. Niedotlenione komórki preferencyjnie indukują ekspresję *COX4-2*, podczas gdy podjednostka *COX4-1* jest degradowana przez mitochondrialną proteazę *LON* (*Lon protease*), która jest również aktywowana przez HIF-1 [54]. Wyżej wymienione mechanizmy regulowane przez HIF-1 odgrywają ważną rolę w utrzymaniu równowagi między zużyciem tlenu a produkcją ATP i ROS, co umożliwia przeżycie komórek nowotworowych w warunkach hipoksji (ryc. 3).



Rycina 3. Geny indukowane przez hipoksję, zależne od aktywacji HIF-1, biorące udział w adaptacji metabolicznej komórek nowotworowych. GLUT-1,3 — transportery glukozy 1,3; HK2 — heksokinaza 2; BNIP3 — białko z rodziny BCL, regulujące śmierć apoptotyczną komórek; *c-myc* — czynnik transkrypcyjny; *MXI1* — białko oddziaływające z *MAX*; TCA — cykl kwasów karboksylowych; PFK1 — fosfofruktokinaza 1; PGK — kinaza fosfoglicerynianowa; PKM2 — kinaza pirogronianowa M2; LDH — dehydrogenaza mleczanowa; PDH — dehydrogenaza pirogronianowa; PDK1 — kinaza dehydrogenazy pirogronianowej; FASN — syntaza kwasów tłuszczowych; COX4-2 — podjednostka oksydazy cytochromu *c*; MCT4 — membranowy transporter mleczanu; LON — proteaza; CAIX — anhidraza węglanowa IX

Wpływ hipoksji na zmiany w metabolizmie lipidów

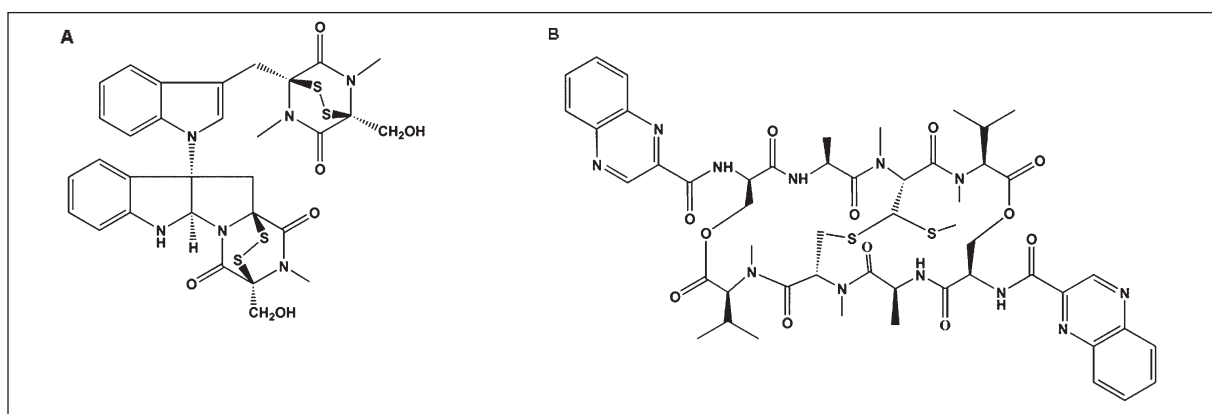
Kwasy tłuszczowe są nie tylko ważnym substratem energetycznym, ale także są niezbędne do biosyntezy błon komórkowych oraz do lipidowej modyfikacji białek [30, 55]. W prawidłowych warunkach syntaza kwasów tłuszczowych (*fatty acid synthase*, FASN) przekształca nadmiar węglowodanów do kwasów tłuszczowych, które są estryfikowane i magazynowane w postaci triacylogliceroli. Te z kolei w warunkach zapotrzebowania dostarczają energię na drodze β -oksydacji [55, 56]. Większość komórek preferencyjnie zużywa egzogenne kwasy tłuszczowe z krwioobiegu do syntezy nowych strukturalnych lipidów. W związku z tym synteza kwasów tłuszczowych *de novo* w prawidłowych komórkach jest zahamowana i ekspresja FASN jest podtrzymywana na niskim poziomie [57]. W przeciwieństwie do komórek prawidłowych komórki nowotworowe charakteryzują się zwiększoną syntezą kwasów tłuszczowych *de novo* [30, 57, 58]. Duża ilość endogennie zsyntetyzowanych kwasów tłuszczowych w komórkach nowotworowych jest estryfikowana do fosfolipidów, które są niezbędne do syntezy błon szybko proliferujących komórek [55, 56]. Zwiększony katabolizm glukozy w komórkach nowotworowych indukowany niedotlenieniem prowadzi do powstania nadmiernej ilości końcowego produktu glikolizy, pirogronianu. Większość pirogronianu jest przekształcana do mleczanu, podczas gdy część do acetylo-CoA, który bierze udział w syntezie kwasów tłuszczowych *de novo* [56]. Zwiększenie syntezy kwasów tłuszczowych *de novo* w komórkach nowotworowych odzwierciedlone jest w znacząco podwyższonej ekspresji kluczowych enzymów lipogenezy między innymi: FASN, liazy cytrynianowej zależnej od ATP (*ATP citrate lyase*, ACL) oraz karboksylazy acetyloCoA (*acetyl-CoA carboxylase*, ACC) [59]. Nadekspresja FASN występuje w różnych typach nowotworów, między innymi w raku prostaty, jajnika, endometrium, jelita grubego, żołądka [57]. W komórkach nowotworowych transkrypcyjna regulacja tego enzymu jest jednym z istotnych mechanizmów zwiększonej jego ekspresji [56, 55]. Ostatnie badania wykazały, że niedotlenienie komórek nowotworowych przyczynia się do zwiększonej ekspresji FASN poprzez stymulację ekspresji białka SREBP-1 (*Sterol regulatory-element binding protein 1*, SREBP-1), która jest zależna od aktywacji HIF-1 [60]. SREBP-1 jest to czynnik transkrypcyjny, który głównie reguluje transkrypcję enzymów biorących udział w syntezie kwasów tłuszczowych (ACC, ACL, FASN) oraz białka, regulującego lipogenezę SPOT 14 [61]. Wykazano, że w warunkach hipoksji dochodzi do znacznie zwiększonego przyłączenia SREBP-1 do promotora dla FASN i zwiększonej transkrypcji tego genu [60]. Zgodnie z wynikami tych badań analiza immunohistologiczna raka piersi pokazała kolokalizację zwiększonej ekspresji FASN i SREBP-1 głównie w hipoksyjnych regionach guza [60]. Zahamowanie ekspresji FASN indukuje śmierć komórek *in vitro* i regresję guza *in vivo* [62].

Znaczenie kliniczne hipoksji guzów i zmian metabolizmu komórek nowotworowych

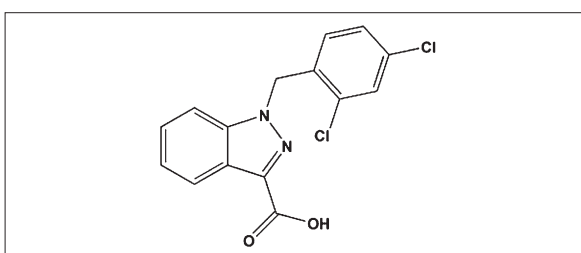
Hipoksja guzów stanowi duży problem terapeutyczny, ponieważ przyczynia się do oporności na standardowe schematy leczenia za pomocą chemioterapii i radioterapii. Zrozumienie biologicznych i molekularnych różnic pomiędzy prawidłowymi i nowotworowymi komórkami jest istotne dla opracowania i rozwoju leków przeciwnowotworowych o selektywnej aktywności [63, 64]. Dlatego niedotlenienie guzów i zmiany metabolizmu komórek nowotworowych stanowią dogodny punkt uchwytu w selektywnej terapii przeciwnowotworowej, do której można zaliczyć leki bioredukcyjne, zahamowanie aktywności czynnika transkrypcyjnego HIF-1 oraz selektywną terapię genową [65]. Szybko rozwijającym się nurtem w terapii przeciwnowotworowej są leki bioredukcyjne, które są specyficznie aktywowane przez enzymy redukcyjne w niedotlenionych komórkach. Te proleki po aktywacji generują cytotoksyczne rodniki reagujące z DNA i powodują selektywną apoptozę komórek nowotworowych [65, 66]. Obiecującym celem terapeutycznym jest czynnik transkrypcyjny HIF-1, którego aktywacja powoduje nie tylko przestrojenie metabolizmu, ale także ma wpływ na wiele innych istotnych aspektów biologii nowotworu, m.in. stymulację angiogenezy [41, 55]. HIF-1 jest atrakcyjnym celem dla terapii przeciwnowotworowej, ponieważ jego aktywność w prawidłowych tkankach jest nieznaczna, a zatem działanie uboczne na prawidłowe komórki powinno być minimalne. Obecnie testowane są różne małowcząsteczkowe inhibitory HIF-1, m.in. echinomycina i syntetyczne poliamidy oraz chetomin. Dwa pierwsze inhibitory blokują wiązanie się HIF-1 z DNA w jądrze komórkowym, natomiast chetomin hamuje przyłączanie białka p300 (*p300/cyclic-AMP-response-element binding protein*) (ryc. 4). Białko to jest kluczowym koaktywatorem HIF-1, poprzez przyłączenie się do HIF-1 w jądrze zwiększa jego aktywność transkrypcyjną [18].

Cechą charakterystyczną komórek nowotworowych jest zwiększenie glikolizy, co umożliwia przeżycie i proliferację komórek w warunkach hipoksji. Farmakologiczne zahamowanie tego procesu stanowi również dogodny cel dla terapii selektywnej w onkologii [63, 64]. Do glikolitycznych inhibitorów należą m.in. następujące związki: 2-deoksyglukoza, 3-bromopirogronian Lonidamina oraz inhibitory dehydrogenazy mleczanowej. 2-deoksyglukoza jest niemetalizowanym analogiem glukozy, w wyniku czego ulega akumulacji w komórce, prowadząc do zablokowania glikolizy. Natomiast 3-bromopirogronian i Lonidamina hamują aktywność heksokinazy [63, 64, 67] (ryc. 5).

Wzrost transportu glukozy do komórek nowotworowych jest wykorzystywany klinicznie do detekcji guzów i ich przerzutów za pomocą pozytronowej emisyjnej tomografii przy użyciu analogu glukozy, 18F-fluorodeoksyglukozy (FDG-PET) [68]. Wzrost ekspresji specyficznych białek



Rycina 4. Wzory strukturalne wybranych inhibitorów HIF-1; a) chetomin; b) echinomycina



Rycina 5. Wzór strukturalny inhibitora glikolizy — lonidaminy

w komórkach nowotworowych pod wpływem hipoksji i aktywacji HIF-1 wykorzystuje się również jako markery nowotworowe do wykrywania i monitorowania progresji nowotworów. Kinaza pirogronianowa M2 stosowana jest jako marker w diagnozowaniu różnych rodzajów nowotworów, szczególnie przewodu pokarmowego. Jej obecność wykrywana jest w osoczu i kale [32]. Podobnie CAIX jest powszechnym markerem prognostycznym w różnych ludzkich nowotworach, m.in. w raku płuc, piersi, szyjki macicy oraz w raku płaskonabłonkowym głowy i szyi [47, 48]. Nowe osiągnięcia badań w zrozumieniu różnic w metabolizmie komórek nowotworowych dają podstawy do rozwoju nowej generacji leków i testowania nowych terapeutycznych strategii, by efektywniej i selektywniej niszczyć komórki nowotworowe oraz zapobiegać lekooporności związanej z niedotlenieniem [63].

Podsumowanie

Metabolizm komórek nowotworowych jest kontrolowany przez genetyczne mutacje oraz odpowiedź tych komórek na czynniki zewnętrzne mikrośrodowiska guzów. W wyniku utraty genów supresorowych (np. p53) lub aktywacji onkogenów (np. PI3K) dochodzi do indukcji dróg przewodzenia sygnałów kontrolujących przeżycie i proliferację komórek. Te zmiany w szlakach przewodzenia wewnątrzkomórkowego sygnału również wpływają na modyfikację metabolizmu, aby sprostać zapotrzebowaniom szybko dzielących się komórek. Z drugiej strony nieprawidłowe mikrośrodowisko

guzów, charakteryzujące się hipoksją, niskim pH i ograniczoną podażą składników odżywczych, stymuluje odpowiedź komórek nowotworowych na stresowe czynniki zewnętrzne, co także przyczynia się do przeprogramowania metabolizmu komórki patologicznej. Te zmiany adaptacyjne optymalizują metabolizm dla proliferujących komórek poprzez dostarczenie odpowiedniego poziomu energii w formie ATP, biosyntezy metabolitów i utrzymania prawidłowej równowagi redoks. Niedotlenienie i zmiany metabolizmu komórek nowotworowych pod wpływem hipoksji stanowią również cel dla terapii selektywnej w onkologii.

Paulina Olszewska

Zakład Chemii Farmaceutycznej i Analizy Leków
Uniwersytet Medyczny
ul. Muszyńskiego 1, 90–151 Łódź
e-mail: paulina.olszewska@umed.lodz.pl

Otrzymano: 10 stycznia 2012 r.

Przyjęto do druku: 13 marca 2012 r.

Piśmiennictwo

- Vaupel P. The Role of Hypoxia-Induced Factors in Tumor Progression. *The Oncology* 2004; 9: 10–17.
- Forsythe JA, Jiang BH, Iyar NV i wsp. Activation of endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor1. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4604–4613.
- Semenza GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15: 551–578
- Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL i wsp. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metabolism* 2006; 3: 177–185.
- Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P i wsp. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via BH3 domains. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 2570–2581.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 2009; 324: 1029–1033.
- Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev* 2010; 20: 51.
- Mazurek S, Boschek CB, Hugo F i wsp. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Seminars in Cancer Biology* 2005; 15: 300–308.
- Semenza Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Seminars in cancer biology* 2009; 19: 12–16.
- Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 2010; 29: 625–634.

11. Xia X, Lemieux ME, Li W, Carroll JS i wsp. Integrative analysis of HIF binding and transactivation reveals its role in maintaining histone methylation homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 4260–4265.
12. Brahimi-Horn MCH, Chiche J, Pauyssegur J. Hypoxia and cancer. *J Mol Med* 2007; 85: 1301–1307.
13. Le A, Cooper CR, Gouw AM i wsp. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 2037–2042.
14. Wang GL, Jiang BH, Rue EA i wsp. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5510–5514.
15. Markowska J, Mądry R, Grabowski JP i wsp. Niedotlenienie w raku szyjki macicy a odpowiedź na leczenie. *Współ Onkol* 2008; 12: 11–15.
16. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: control of oxygen homeostasis in health and disease. *Pediatr Res* 2001; 49: 614–617.
17. Kaelin WG Jr, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* 2008; 30: 393–402.
18. Michalski B, Banyś A, Droszdzol A i wsp. Komórka niedotleniona celem dla terapii selektywnej w onkologii. *Przeł Menopauz* 2009; 4: 196–201.
19. Maxwell PH. Hypoxia-inducible factor as a physiological regulator. *Exp Physiol* 2005; 90: 791–797.
20. Bardos JI, Ashcroft M. Hypoxia-inducible factor-1 and oncogenic signaling. *Bioassays* 2004; 26: 262–269.
21. Denco NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumor. *Nature Rev Cancer* 2008; 8: 705–707.
22. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; 123: 309–314.
23. Young CD, Anderson SM. Sugar and fat — that's where it's at: metabolic changes in tumors. *Breast Cancer Res* 2008; 10: 202.
24. Airley RE, Mobasher A. Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: novel pathways and targets for anticancer therapeutics. *Chemotherapy* 2007; 53: 233–256.
25. Iyer NV, Kotch LE, Agani F. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Genes Dev* 1998; 12: 149–162.
26. Macheda MW, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol* 2005; 202: 654–662.
27. Mathupala SP, Rempel A, Pedersen PL. Glucose catabolism in cancer cells: identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions. *J Biol Chem* 2001; 276: 43407–43012.
28. Porporato PE, Dhup S, Dadhich RK I wsp. Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumor: a comprehensive review. *Front Pharmacol* 2011; 2: 1–18.
29. Tennant DA. PK-M2 Make Cells Sweeter on HIF1. *Cell* 2011; 145: 647–649.
30. DeBerardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D i wsp. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Genet Dev* 2008; 18: 54–61.
31. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH i wsp. The M2 splice isoforms of pyruvate kinase is important for cancer and tumour growth. *Nature* 2008; 452: 230–233.
32. Hardt PR, Ewald N. Tumor M2 pyruvate kinase: a tumor marker and its clinical application in gastrointestinal malignancy. *Expert Rev Mol Diagn* 2008; 8: 579–585.
33. Luo W, Semenza GL. Pyruvate kinase M2 regulates glucose metabolism by functioning as a coactivator for hypoxia-inducible factor 1 in cancer cells. *Oncotarget* 2011; 2: 551–556.
34. Semenza GL. Regulation of Metabolism by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2011, w druku.
35. Schneider J, Neu K, Grimm H i wsp. Tumor M2-pyruvate kinase in lung cancer patients: immunohistochemical detection and disease monitoring. *Anticancer Res* 2002; 22: 311–318.
36. Ventrucci M, Cipolla A, Racchini C i wsp. Tumor M2-pyruvate kinase, a new metabolic marker for pancreatic cancer. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1149–1155.
37. Kaura B, Bagga R, Patel FD. Evaluation of the pyruvate kinase isoenzyme tumor (Tu M2-PK) as a tumor marker for cervical carcinoma. *J Obstet Gynaecol Res* 2004; 30: 193–196.
38. Oremek GM, Teigelkamp S, Kramer W i wsp. The pyruvate kinase isoenzyme tumor M2 (Tu M2-PK) as a tumor marker for renal carcinoma. *Anticancer Res* 1999; 19: 2599–2601.
39. Schulze G. The tumor marker Tumor M2-PK: an application in the diagnosis of gastrointestinal cancer. *Anticancer Res* 2000; 20: 4961–4964.
40. Zhang B, Chen JY, Chen DD i wsp. Tumor type M2 pyruvate kinase expression in gastric cancer, colorectal cancer and controls. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1643–1646.
41. Le A, Cooper CR, Gouw AM i wsp. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 2037–2042.
42. Firth JD, Ebert BL, Ratcliffe PJ. Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *J Biol Chem* 1995; 8: 270; 21021–21027.
43. Cairns R, Papandreou I, Denko N. Overcoming physiologic barriers to cancer treatment by molecularly targeting the tumor microenvironment. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 61–70.
44. Ullah MS., Davies AJ, Halestrap AP. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent mechanism. *J Biol Chem* 2006; 281: 9030–9037.
45. Kim J-W. Tumor metabolism III: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and tumor metabolic alterations. *BioWave* 2007; 9: 1–15.
46. Wykoff CC, Beasley NJP, Watson PH i wsp. Hypoxia inducible expression of tumor associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* 2000; 60: 7075–7083.
47. Potter C, Harris AL. Hypoxia inducible carbonic anhydrase IX, marker of tumour hypoxia, survival pathway and therapy target. *Cell Cycle* 2004; 3: 164–167.
48. Supuran CT, Scozzafava A, Casini A. Carbonic anhydrase inhibitors. *Med Res Rev* 2003; 23: 146–189.
49. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L i wsp. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metabolism* 2006; 3: 187–197.
50. Patel MS, Korotchikina LG. Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase complex by phosphorylation: complexity of multiple phosphorylation sites and kinases. *Exp Mol Med* 2001; 33: 191–197.
51. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL i wsp. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metabolism* 2006; 3: 177–185.
52. Corn PG i wsp. Mxi1 is induced by hypoxia in a HIF-1-dependent manner and protects cells from c-Myc induced apoptosis. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 1285–1294.
53. Dang CV, Kim J, Gao P i wsp. The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nature Rev Cancer* 2008; 8: 51–56.
54. Fukuda R, Zhang H, Kim JW i wsp. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunit composition to optimize the efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* 2007; 129: 111–122.
55. Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nature Rev Cancer* 2007; 7: 763–777.
56. Kuhajda FP. Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway. *Cancer Res* 2006; 6: 5977–5980.
57. Mashima T, Seimiya H, Tsuruo T. *De novo* fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. *Br J Cancer* 2009; 100: 1369–1372.
58. Esehie A, Du G. Increased lipogenesis in cancer. *Com. Integrative Biol* 2009; 2: 1–4.
59. Swinnen JV, Brusselmans K, Verhoeven G. Increased lipogenesis in cancer cells: new, novel targets. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006; 9: 358–365.
60. Furuta E, Pai SK, Zhan R I wsp. Fatty acid synthase gene is up-regulated by hypoxia via activation of Akt and sterol regulatory element binding protein-1. *Cancer Res* 2008; 68: 1003–1011.
61. Martel PM, Bingham CM, McGraw CJ i wsp. S14 protein in breast cancer cells: direct evidence of regulation by SREBP-1c, superinduction with progestin, and effects on cell growth. *Exp Cell Res* 2006; 312: 278–288.
62. Pizer ES, Jackisch C, Wood FD i wsp. Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. *Cancer Research* 1996; 56: 2745–2747.
63. Xu R-H, Pelicano H, Zhou Y i wsp. Huang P. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res* 2005; 65: 613–621.
64. Pelicano H, Martin DS, Xu R-H i wsp. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 2006; 25: 4633–4646.
65. Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Cancer* 2004; 4: 437–447.
66. Brown JM. Tumor Hypoxia in Cancer Therapy. *Methods in Enzymology* 2007; 435: 297–321.
67. Di Cosimo S, Ferretti G, Papaldo P i wsp. Lonidamine: efficacy and safety in clinical trials for the treatment of solid tumors. *Drugs Today (Barc.)* 2003; 39: 157–174.
68. Rajendran JG, Mankoff DA, Sullivan F i wsp. Hypoxia and glucose metabolism in malignant tumors: evaluation by 18F-fluoromisonidazole and 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2245–2252.