

## Jak oddychają komórki nowotworowe?

Anna Gasińska<sup>1,2</sup>, Anna Janecka<sup>1</sup>, Agnieszka Adamczyk<sup>1</sup>, Dorota Słonina<sup>1</sup>

To, że komórki nowotworowe prowadzą inny metabolizm niż komórki prawidłowe sugerował jako pierwszy niemiecki biochemik Otto Warburg na początku ubiegłego wieku. Wykazał, że komórki nowotworowe preferują proces oddychania beztlenowego, a nie tlenowego, charakterystyczny dla komórek prawidłowych. Przekształcają duże ilości glukozy do mleczanu w procesie fermentacji mlekowej, prowadzonej nawet w obecności tlenu. Zjawisko to dziś znane jest pod pojęciem *efektu Warburga* lub glikolizy tlenowej. Biochemik przyczynę tego zjawiska upatrywał w uszkodzeniu mitochondriów. Do niedawna nie było wiadomo, jaki proces chemiczny kryje się za „efektem Warburga”. Wiadomo, że wiele komórek proliferujących, w tym nowotworowych, cechuje wzmożone pobieranie glukozy i ograniczenie fosforylacji oksydacyjnej. Ta ścieżka metaboliczna utrzymuje wysoki poziom produkcji mleczanu, nawet w obecności tlenu. Obecnie sugeruje się, że powstałe metabolity mogą spełniać rolę podobną do onkogenów poprzez zmianę szlaków sygnalizacyjnych i zablokowanie różnicowania komórek. Zmiany te ułatwiają proces onkogenezy i wzrost komórek. Dużą rolę w zmianie metabolizmu odgrywa kinaza pirogronianowa (PK) — enzym biorący udział w szlaku glikolitycznym, który w komórkach nowotworowych jest zastępowany przez izoformę PKM2, co jest konieczne do przekierowania metabolizmu na szlak glikolizy tlenowej i jest warunkiem nowotworzenia. Stwierdzono również, że PKM2 odpowiada za homeostazę reakcji redoks, czego dowodem jest uruchomienie szlaku pentozowego, który ogranicza akumulację reaktywnych form tlenu i chroni komórki nowotworowe przed stresem oksydacyjnym, ułatwiając tym samym ich wzrost. Ostatnio zaproponowano nowy model metabolizmu nowotworu, potwierdzony eksperymentalnie, który nosi nazwę *odwrotnego efektu Warburga*. Model ten zakłada ścisłą współpracę metaboliczną pomiędzy aktywowanymi fibroblastami podścieliska a komórkami nowotworowymi, i dowodzi, że komórki nowotworowe głównie oddychają tlenowo. Proces glikolizy tlenowej (efekt Warburga) natomiast jest przeprowadzany przede wszystkim przez fibroblasty zrębu nowotworu. Komórki prawidłowe podścieliska, głównie fibroblasty, dzięki zachodzącym w nich pod wpływem stresu oksydacyjnego licznym procesom katabolicznym (autofagia, mitofagia, fermentacja mlekowa) dostarczają komórkom nowotworowym wysokoenergetycznych związków, takich jak mleczan, ketony czy glutamina, które wykorzystują je jako biopaliwo do reakcji syntez. Komórki te, dzięki dostarczonym substratom, mogą przeprowadzać liczne procesy anaboliczne oraz wytwarzać duże ilości ATP w procesie oddychania tlenowego. Umożliwia to ich wzrost i rozwój, a zatem — progresję nowotworu.

### How tumour cells respire?

Otto Warburg at the beginning of the 20<sup>th</sup> century suggested that cancer cells exhibit different metabolism than normal cells. He demonstrated that tumour cells prefer aerobic glycolysis rather than oxidative respiration as for normal cells. They convert large amounts of glucose to lactate in the process of glycolysis, and even in the presence of oxygen. The phenomenon is known as the Warburg effect or aerobic glycolysis. The biochemist hypothesized that the cause of this is mitochondrial damage in tumour cells. The reason why cells undergo the Warburg effect is still poorly understood. However it is known that many proliferating cells, also malignant cells, show increased uptake of glucose and restriction of oxidative phosphorylation. This metabolic pathway facilitates high levels of lactate production, even in the presence of oxygen. Recent evidence suggests that metabolites themselves can be oncogenic by altering cell

<sup>1</sup>Zakład Radiobiologii Klinicznej  
Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Krakowie

<sup>2</sup>Katedra Kosmetologii  
Górnośląska Wyższa Szkoła Handlowa

signaling and blocking cellular differentiation. These changes facilitate the process of oncogenesis and cell growth. The pyruvate kinase (PK), a glycolytic enzyme is replaced by isoform of PKM2 which facilitates aerobic glycolysis in cancer cells. PKM2 is also a regulator of cellular anti-oxidative metabolism which promotes cancer growth by activating pentose phosphate pathway, maintaining the balance of redox equivalents and activating antioxidant defence system. Recently there has been proposed a new model of cancer metabolism, which has been proved experimentally, termed *reverse Warburg effect*. This model explains the role of aerobic glycolysis and lactate production in fueling tumour growth. This model assumes metabolic cooperation between stromal fibroblasts and tumour cells, and that cancer cells perform oxidative respiration. In activated fibroblasts, oxidative stress in the tumour microenvironment leads to autophagy, mitophagy and aerobic glycolysis, which delivers high-energetic intermediates such as lactate, ketones and glutamine to tumour cells that fuel the anabolic growth. Tumour cells due to delivered nutrients can lead anabolic metabolism and produce high amounts of ATP what facilitates tumour growth, development and progression.

NOWOTWORY Journal of Oncology 2013; 63, 2: 124–131

**Słowa kluczowe:** oddychanie komórek nowotworowych, efekt Warburga, glikoliza tlenowa

**Key words:** tumour cell respiration, Warburg effect, aerobic glycolysis

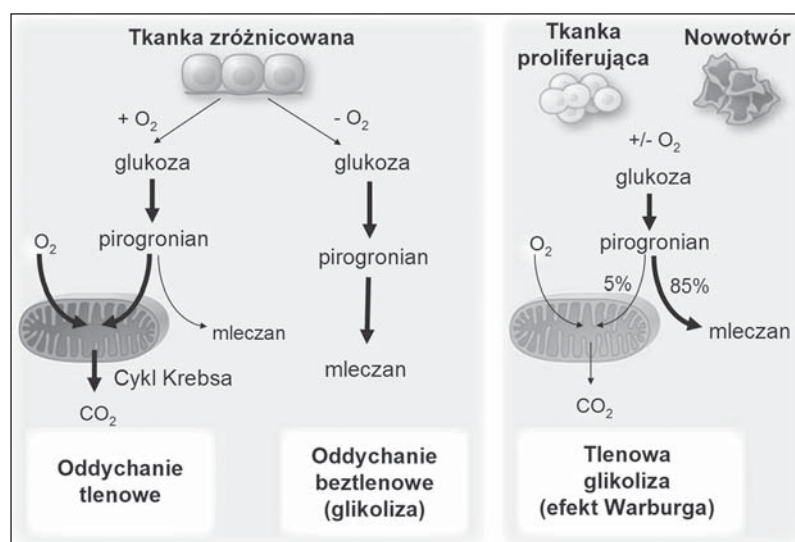
### Jak oddychają komórki nowotworowe?

Prawidłowe, zróżnicowane komórki zdobywają energię niezbędną do prowadzenia funkcji życiowych w procesie oddychania tlenowego przeprowadzanego w mitochondriach. W obecności tlenu większość zróżnicowanych komórek metabolizuje glukozę do dwutlenku węgla i wody w wyniku reakcji utleniania. Biochemik niemiecki Otto Warburg na początku ubiegłego wieku jako pierwszy sugerował, że komórki nowotworowe mają inny metabolizm niż komórki prawidłowe [1]. Wykazał, że komórki nowotworowe preferują proces oddychania beztlenowego, a nie tlenowego jak komórki prawidłowe. Przekształcają duże ilości glukozy do mleczanu w procesie fermentacji mlekowej, prowadzonej nawet w obecności tlenu [2]. Zjawisko to dziś jest znane pod pojęciem *efektu Warburga* lub glikolizy tlenowej. Biochemik przyczynę tego zjawiska upatrywał w uszkodzeniu mitochondriów. Choć później ustalono, że nie defekt mitochondrium jest przyczyną powstania nowotworu ani powodem prowadzenia glikolizy tlenowej [3], korzyści z prowadzenia wzmożonej glikolizy przez komórki nowotworowe nadal pozostają nie w pełni wyjaśnione.

Do niedawna nie było wiadomo, jaki proces chemiczny kryje się za „efektem Warburga”. Wiadomo, że wiele komórek nowotworowych cechuje wzmożone pobieranie glukozy i ograniczenie fosforylacji oksydacyjnej. Ta ścieżka metaboliczna gwarantuje wysoki poziom produkcji mleczanu, nawet w obecności tlenu. Stwierdzono, że komórki tkanek prawidłowych, z których komórki nowotworowe się wywodzą, nie prowadzą glikolizy tlenowej. Ale wykazano, że taką formę oddychania mogą prowadzić szybko proliferujące komórki prawidłowe [4]. Tak więc powrót komórek nowotworowych do metabolicznego fenotypu charakterystycznego dla komórek szybko proliferujących sugeruje, że glikoliza

tlenowa musi być bardziej korzystna dla proliferacji [4]. Obecnie dostarczono wielu dowodów świadczących o tym, że ten aktywny proces metaboliczny występuje w wyniku przeprogramowania protoonkogenów, zmiany szlaków sygnalizacyjnych i zablokowania różnicowania komórek w celu ułatwienia onkogenezy [5]. Wykazano, że pojedyncza zmiana potranskrypcyjna kinazy pirogronianowej (PKM1), enzymu biorącego udział w szlaku glikolitycznym, powoduje powstanie izoformy PKM2, która jest konieczna do przekierowania metabolizmu komórek na drogę glikolizy tlenowej, co promuje nowotworzenie [6]. W warunkach naturalnych PKM2 występuje głównie w komórkach embrionalnych [6, 7], co świadczy o tym, że zainicjowana zmiana indukuje powstanie fenotypu występującego w pierwotnych komórkach.

Ostatnio zaproponowano nową hipotezę dotyczącą metabolizmu nowotworu, sugerującą współpracę pomiędzy aktywowanymi fibroblastami podścieliska a komórkami nowotworowymi. Zakłada ona pełną zdolność mitochondriów komórek nowotworowych do przeprowadzenia oddychania tlenowego i dostarcza dowodów, że *efekt Warburga* (glikoliza tlenowa) występuje głównie w fibroblastach zrębu, a nie w komórkach nowotworowych [8, 9]. Komórki prawidłowe podścieliska, głównie fibroblasty, dzięki zachodzącym w nich pod wpływem stresu oksydacyjnego licznym procesom katabolicznym (autofagia, mitofagia, fermentacja mlekowa) dostarczają komórkom nowotworowym wysokoenergetycznych związków, takich jak mleczan, ketony czy glutamina, które są biopaliwem do reakcji syntez [9]. Komórki nowotworowe, wykorzystując dostarczone substraty, mogą przeprowadzać liczne procesy anaboliczne oraz wytwarzać duże ilości adenozynotrifosforanu (ATP) w procesie oddychania tlenowego. Umożliwia to ich wzrost



**Rycina 1.** Schemat przedstawiający różnice pomiędzy oddychaniem tlenowym, beztlenowym i glikolizą tlenową (efektem Warburga). W obecności tlenu, nieproliferujące (zróżnicowane) komórki, w pierwszej kolejności metabolizują w procesie glikolizy glukozę do pirogronianu, który jest całkowicie utleniany w mitochondriach do CO<sub>2</sub> i wody. Obecność tlenu w tej reakcji jest konieczna, ponieważ jest on akceptorem elektronów i musi być obecny w reakcji utleniania glukozy. Kiedy ilość tlenu jest ograniczona, komórki mogą przekierować pirogronian powstały w czasie glikolizy na drogę fermentacji mlekowej i utworzyć mleczań. Komórki proliferujące i nowotworowe z kolei przeprowadzają proces glikolizy tlenowej, w którym glukoza w 85% przekształcana jest do mleczań (nawet w obecności tlenu). Mitochondria (także w komórkach nowotworowych) mogą funkcjonować prawidłowo. Około 10% glukozy jest kierowane na inną ścieżkę biosyntetyczną metabolizmu (cykl pentozowy). Zmodyfikowany schemat z publikacji Vander Heiden i wsp. [11]

i rozwój, a zatem — progresję nowotworu. Hipoteza ta nosi nazwę *odwrotnego efektu Warburga* [8, 9].

### Proces oddychania komórek

Oddychanie komórkowe jest procesem katabolicznym, w którym następuje rozkład złożonych związków organicznych na związki prostsze, z utworzeniem energii w formie ATP, którą organizmy zużywają na podstawowe procesy życiowe, takie jak wzrost, ruch czy utrzymanie stałej temperatury ciała. Proces oddychania wykryto w komórkach wszystkich organizmów żywych. Głównym i podstawowym substratem tego procesu jest glukoza, z której atomy wodoru transportowane są poprzez szereg złożonych cykli metabolicznych do mitochondrium, gdzie w obecności atomów tlenu (wdychanego) utleniają się do wody. Ten proces kataboliczny nazywa się oddychaniem tlenowym. W przypadku oddychania beztlenowego organizmy uzyskują energię z rozkładu związków organicznych bez udziału tlenu lub w wyniku rozkładu prostych związków nieorganicznych. Początkowe przemiany, nazywane glikolizą, są wspólne dla obydwóch rodzajów oddychania i zachodzą bez udziału tlenu w cytoplazmie komórki. Podczas glikolizy sześciowęglowa cząsteczka glukozy ulega przemianie w dwie trójwęglowe cząsteczki kwasu pirogronowego przy udziale enzymu kinazy pirogronianowej (PK). Dalszy los pirogronianu zależy od typu oddychania, jaki prowadzi dany organizm/komórka (ryc. 1).

Oddychanie beztlenowe (fermentacja) w całości zachodzi w cytoplazmie komórki, a jego nazwa zależy od ostatecznego produktu, jaki w tym procesie powstaje. Najczęściej wymienia się fermentację alkoholową (końcowy produkt — etanol) i mlekową (końcowy produkt — kwas mlekowy). Mleczań powstaje np. w mięśniach, podczas zwiększonego wysiłku fizycznego w stosunku do normy dla danego osobnika, kiedy zapotrzebowanie na energię zbiega się z chwilowym brakiem tlenu. Wykazano, że beztlenowe oddychanie występuje również w komórkach macierzystych tkanek prawidłowych (embrionalne, hematopoetyczne, mezenchymalne, nerwowe) oraz nowotworowych, którym stan hipoksji pomaga w utrzymaniu niezróżnicowanego fenotypu [10]. Ten rodzaj oddychania preferują także prawidłowe i nowotworowe komórki proliferujące (ryc. 1), w których tylko niewielka ilość glukozy utleniana jest do dwutlenku węgla [4].

W oddychaniu tlenowym z kolei pirogronian transportowany jest do mitochondrium, gdzie ulega dalszym przemianom w obecności tlenu (ryc. 1). Powstaje octan, który łączy się z koenzymem A, tworząc acetylo-CoA, wchodzący w cykl skomplikowanych reakcji enzymatycznych nazywanych *cyklem kwasu cytrynowego* lub *cyklem Krebsa*. W cyklu reakcji z acetylo-CoA powstaje CO<sub>2</sub>, a wodory zostają przeniesione na dinukleotyd nikotynamidowy (NAD) i flawinoadeninowy (FAD), by później w trakcie reakcji z tlenem wytworzyć cząsteczki ATP. Zredukowane nukleotydy NADH i FADH<sub>2</sub>, które

są źródłem protonów i elektronów w ostatnim, najważniejszym pod względem energetycznym etapie oddychania tlenowego — fosforylacji oksydacyjnej i chemiosmozie.

Oddychanie beztlenowe jest niewydajne energetycznie, gdyż prowadzi do powstania jedynie dwóch cząsteczek ATP, co pokrywa zapotrzebowanie na energię tylko małych organizmów, takich jak bakterie czy drożdże. Z tego powodu zdecydowana większość organizmów przeprowadza proces oddychania tlenowego, w którym powstaje aż 36 cząsteczek ATP oraz CO<sub>2</sub> i woda.

W organizmach wielokomórkowych większość komórek ma stały dostęp do środków odżywczych. W przypadku występowania nadmiernej ilości substancji odżywczych istniejący system kontroli zapobiega nieplanowanym podziałom komórek, ponieważ dzielą się one tylko po stymulacji czynnikami wzrostu. W prawidłowych komórkach ssaków niekontrolowane podziały nie występują. Komórki nowotworowe natomiast pomijają zależność od czynników wzrostu poprzez nabywanie mutacji, które zmieniają funkcje szlaków sygnalizacyjnych w wyniku zmiany funkcji receptorów. Wiele danych dowodzi, że te ścieżki sygnalizacyjne konstytutywnie aktywują pobieranie i metabolizm środków odżywczych, promując przeżycie komórki i dostarczając paliwa do jej wzrostu. Mutacje powstałe w protoonkogenach mogą wpływać na zwiększone pobieranie środków odżywczych, szczególnie glukozy, co jest niezbędne do wzrostu i proliferacji [5]. Ale metabolizm komórek nowotworowych znacznie różni się od metabolizmu komórek zróżnicowanych (ryc. 1). Większość komórek dojrzałego organizmu wykorzystuje związki pokarmowe do produkcji energii potrzebnej do podtrzymania procesów życiowych, natomiast proliferujące komórki nowotworowe wykorzystują związki pokarmowe do produkcji energii oraz do syntezy makromolekuł. Różnica ta, zaobserwowana przez Otto Warburga [1, 2] i potwierdzona przez wielu badaczy, świadczy o tym, że komórki nowotworowe pobierają o wiele większe ilości glukozy niż komórki prawidłowe, oraz że wykazują wysoki poziom glikolizy i produkcji młeczanu nawet w warunkach dużej dostępności tlenu [11, 12].

Długo nie było wiadomo, dlaczego mniej efektywny metabolizm — 2 cząsteczki ATP z 1 cząsteczki glukozy zamiast 36 cząsteczek ATP — może być preferowany przez komórki nowotworowe. Wyjaśnienie tej sprzeczności było trudne, ponieważ nasze rozumienie ścieżek sygnalizacyjnych metabolizmu opiera się głównie na badaniu nieproliferujących komórek w zróżnicowanych tkankach. Postęp w biologii molekularnej pozwolił na ustalenie, że nie tylko nowotworowe, ale również prawidłowe proliferujące komórki preferują metabolizowanie glukozy na drodze tlenowej glikolizy. Dalsze badania w zakresie zapotrzebowania energetycznego proliferujących komórek powinny przyczynić się do wyjaśnienia związku pomiędzy ścieżkami sygnalizacyjnymi, które kierują wzrostem i regulacją metabolizmu komórki.

## **Rola kinazy pirogronianowej w regulacji procesu glikolizy**

Kinaza pirogronianowa jest enzymem z klasy transferaz i bierze udział w szlaku glikolitycznym. Katalizuje przeniesienie grupy fosforanowej z fosfoenolopirogronianu (PEP) na ADP, w wyniku czego powstaje pirogronian i ATP. Reakcja ta jest praktycznie nieodwracalna, ze stałą równowagą silnie przesuniętą na korzyść powstawania pirogronianu i ATP. Jest to ostatni etap glikolizy i tym samym PK kontroluje wpływ związków z tego szlaku. W organizmie człowieka i innych ssaków występują 4 izoenzymy PK oznaczane jako PKM1, PKM2, PKR i PKL, które różnią się strukturą pierwszorzędową, właściwościami kinetycznymi i ekspresją tkankowo specyficzną. Izofomy PKM1 i PKM2 są kodowane przez ten sam gen *PKM* [6]. Izofoma PKM2 jest uważana za „prototyp”, gdyż występuje w tkankach płodowych, komórkach macierzystych, komórkach proliferujących oraz w nowotworach. W czasie rozwoju organizmu izofoma PKM2 jest zastępowana przez izofomę PKM1 w mięśniach szkieletowych, sercu i mózgu, przez izofomę PKR w tkankach krwiotwórczych i erytrocytach oraz przez izofomę PKL w wątrobie [6].

W komórkach prawidłowych kinaza pirogronianowa (PKL) jest także enzymem regulatorowym w procesie glukoneogenezy, szlaku metabolicznego przebiegającego w wątrobie i polegającego na przekształcaniu pirogronianu, młeczanu i innych substancji w glukozę. Kiedy kinaza pirogronianowa jest dezaktywowana poprzez fosforylację (co ma miejsce podczas głodu, na skutek działania glukagonu), fosfoenolopirogronian (PEP) nie może być przekształcany do pirogronianu. Jest on natomiast konwertowany do glukozy na drodze glukoneogenezy. Powstała wówczas glukoza jest wydalana z wątroby i rozprowadzana do tkanek znajdujących się w stanie głodu.

Podobne działanie PK stwierdzono w komórkach nowotworowych, gdzie izofoma PKM1 zastępowana jest przez izofomę PKM2 [6]. W beztlenowym procesie chemicznym uzyskiwania przez komórki nowotworowe energii do rozwoju enzym ten odgrywa najważniejszą rolę i pozwala na przerabianie dużych ilości glukozy, co umożliwia niekontrolowany i błyskawiczny rozwój guza. Potwierdzono to również w badaniach eksperymentalnych, w których zamiana izofomy PKM2 na PKM1 powodowała zahamowanie wzrostu nowotworu [7].

Wykazano, że komórki macierzyste tkanek prawidłowych, znajdujące się w hipoksycznych niszach, charakteryzują się niską proliferacją i wykazują duży metabolizm glukozy [13]. Wskazywać to może na wpływ hipoksji na metabolizm glukozy. Rzeczywiście udowodniono, że w komórkach nowotworowych izofoma PKM2 aktywuje czynnik transkrypcyjny HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*), który promuje wysoki metabolizm glukozy (glikolizę), a hamuje fosforylację oksydacyjną. Następnie obydwa białka wpływają na uruchamianie ekspresji określonych genów od-



powiedzialnych za przystosowanie do warunków hipoksji [14]. Wysoką aktywność izoformy PKM2 stwierdzono także w komórkach prawidłowych (nerki, płuca, wątroby, jelit) oraz komórkach macierzystych, które są wyjątkowo wrażliwe na stres oksydacyjny [15].

W komórkach nowotworowych zamiana izoformy PKM1 na PKM2 wpływa na przekierowanie metabolizmu glukozy na szlak pentozowy, w którym ulega ona przemianie na innej drodze niż glikoliza i dostarcza intermediatów do reakcji biosyntezy. Szlak ten pełni więc funkcje kataboliczne i anaboliczne. Aby sprostać tym dwóm zadaniom, szybkość przemiany glukozy w pirogronian jest regulowana. Dlatego PKM2 odgrywa rolę regulacyjną w *efekcie Warburga*. Otto Warburg stwierdził, że komórki w czasie nowotworzenia zmieniają oddychanie z tlenowego na beztlenowe (fermentację), co zostało potwierdzone obecnie przez innych badaczy [7, 14, 16].

### **Rola kinazy pirogronianowej w regulacji stresu oksydacyjnego i metabolizmu komórek nowotworowych**

W procesie nowotworzenia specyficzne tkankowo izoformy PKM1 są zastępowane przez izoformę PKM2, która występuje w 2 formach: tetrameru i dimeru. W przeciwieństwie do formy tetramerycznej, która jest w pełni aktywna, dimer jest niemal całkowicie pozbawiony właściwości katalitycznych [6]. Białko to ma unikalną rolę regulacyjną, ponieważ zmniejszenie jego katalitycznej aktywności jest łączone z progresją guza i rozwojem *efektu Warburga*. Z powodu możliwości przechodzenia z aktywnej formy tetramerycznej w prawie nieaktywną formę dimeryczną PKM2 uważana jest za przełącznik metaboliczny i kluczowy regulator *efektu Warburga* [6]. Obecnie wiadomo, że dysocjację tetrameru do dimeru mogą powodować onkoproteiny, np. kinaza pp60 i E7 HPV-16 (*human papilloma virus 16*), białka supresorowe, a także intermediaty metabolizmu (m.in. fruktoza, aminokwasy, np. seryna, L-leucyna, L-cysteina) [6]. Kinaza pp60v-src katalizuje reakcję fosforylacji tetrameru PKM2, co prowadzi do jego rozpadu na dimery, podobnie w przypadku onkoproteiny E7 HPV-16 bezpośrednie przyłączenie tego białka do izoenzymu PKM2 powoduje rozpad na dimery [17]. Najnowsze badania wykazały również, że aktywność izoenzymu PKM2 w komórkach nowotworowych jest hamowana przez peptydy sygnałowe zawierające ufosforylowane tyrozyny, np. naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu [18]. Kiedy stężenie PKM2 staje się odpowiednio wysokie, dochodzi do reasocjacji nieaktywnej formy dimerycznej w aktywną tetrameryczną [17].

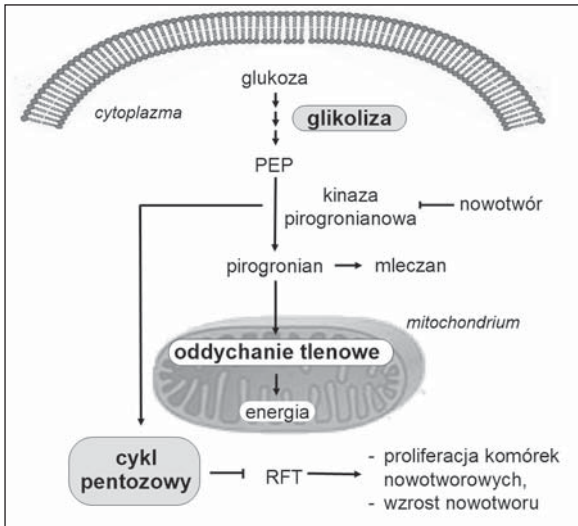
Mogłoby się wydawać, że występowanie PKM2 w nieaktywnej formie w komórkach charakteryzujących się wysokim poziomem glikolizy i produkcji mleczanu jest sprzecznością. Staje się to jasne, kiedy weźmie się pod uwagę inną cechę charakteryzującą komórki nowotworowe — wysokie

tempo podziałów komórkowych. Odwracalne hamowanie izoenzymu PKM2, będące wynikiem dimeryzacji lub wiązania peptydu zawierającego ufosforylowaną tyrozinę, powoduje akumulację intermediatów glikolizy, które mogą być wykorzystane do reakcji biosyntezy. Kinetyczne właściwości izoenzymu PKM2 zapewniają więc komórkom nowotworowym dużą zdolność biosyntezy kwasów nukleinowych, lipidów i białek, co jest niezbędne do proliferacji i wzrostu. Jednocześnie umożliwiają im wydajną syntezę ATP nawet w warunkach niedoboru tlenu, hipoksji.

Kinaza pirogronianowa PKM2 odgrywa również rolę w kontroli reakcji redoks w komórce. We wszystkich żyjących komórkach reaktywne formy tlenu (RFT) powstają w reakcjach, które składają się na oddychanie lub są tworzone jako produkty uboczne takich reakcji jak metabolizm kwasów tłuszczowych i biosyntetyczne reakcje redoks. W trakcie normalnych warunków fizjologicznych nie stanowi to problemu, ponieważ liczba RFT jest utrzymywana na niskim poziomie i w równowadze w wyniku działania cząsteczek redukujących ich aktywność (np. enzymów antyoksydacyjnych). Pewna ilość RFT jest nawet konieczna dla fizjologii komórki. Ale kiedy występująca w prawidłowych warunkach równowaga redoks zostaje zachwiana, następuje uszkodzenie makrocząsteczek, co nieuchronnie prowadzi do śmierci komórki. Z tego powodu komórki nowotworowe wykształciły wewnątrzkomórkowy kompleksowy system antyoksydacyjnej maszyny, która może dynamicznie dostarczać równoważniki redukujące i usuwać RFT w razie potrzeby. Kinaza pirogronianowa PKM2 jest regulatorem antyoksydacyjnego metabolizmu i bierze udział w ujemnym sprzężeniu zwrotnym kontrolując homeostazę reakcji redoks. Wykazano, że kontrola wewnątrzkomórkowego poziomu RFT jest krytyczna dla przeżycia komórek nowotworowych [12, 19]. Znaczny wzrost poziomu RFT powoduje zahamowanie aktywności PKM2 w wyniku utleniania cytozyny [19, 20]. Zahamowanie aktywności tego enzymu jest konieczne do przełączenia metabolizmu — przekierowania glukozy do szlaku pentozowego, co tym samym powoduje możliwość redukcji RFT i detoksykacji (ryc. 2). Ta ścieżka metaboliczna wytwarza NADPH — równoważniki redukujące antyoksydacyjnego systemu komórki, co zwiększa zdolności ochronne komórki w reakcjach redoks. PKM2 uczestniczy również w dodatnim sprzężeniu zwrotnym, które poprzez HIF-1 promuje zmianę metabolizmu glukozy w komórkach nowotworowych (zwiększa pobór glukozy i produkcję mleczanu oraz zmniejsza konsumpcję tlenu) [14].

### **Cykl pentozowy**

Glukoza może zostać utleniona także inną drogą niż opisana powyżej glikoliza, w oksydacyjnym szlaku pentozofosforanowym (ryc. 2). Cechą tej reakcji jest dostarczenie komórce NADPH niezbędnego do przeprowadzania reakcji redukcji (syntezy kwasów tłuszczowych, cholesterolu) w cy-

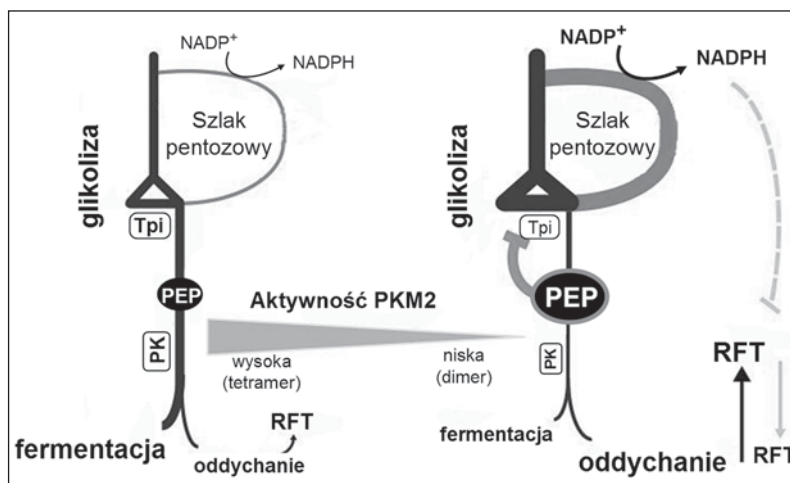


**Rycina 2.** Schemat zmiany metabolizmu komórek nowotworowych pod wpływem kinazy pirogronianowej PKM2. W warunkach tlenowych, w cytoplazmie komórki glukoza ulega rozkładowi do pirogronianu, który następnie transportowany jest do mitochondrium, by w procesie oddychania tlenowego dostarczyć energii komórce. W proliferujących komórkach w warunkach beztlenowych pirogronian jest przekształcany do mleczanu. W komórkach nowotworowych PKM2 o zredukowanej aktywności kieruje pirogronian na szlak pentozowy, co zapewnia równowagę reakcji redoks

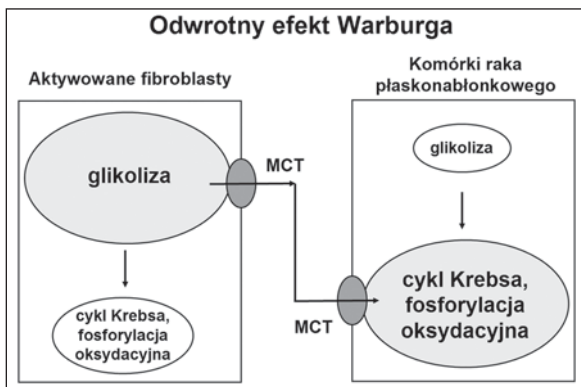
toplazmie oraz synteza pentoz [19, 21]. Metabolity tego szlaku są wspólne z metabolitami glikolizy, dzięki czemu zwiększa się ilość glukozy utlenianej w procesie oddychania. W powyższych przemianach decydującą rolę odgrywa PKM2 [22, 23]. W nowotworach poziom tego enzymu — podobnie jak innych enzymów metabolicznych — wzrasta. Białko to ma unikalną rolę regulacyjną, ponieważ zmniejszenie jego katalitycznej aktywności jest łączone z progresją guza i rozwojem *efektu Warburga*. Niska aktywność kinazy pirogronianowej w komórkach nowotworowych prowadzi do akumulacji jej substratu — PEP [22], co w konsekwencji hamuje enzym glikolityczny — izomerazę triozofosforanową (Tpi) — i prowadzi do aktywacji szlaku alternatywnego do glikolizy — cyklu pentozowego (ryc. 3). Wzrost aktywności tej ścieżki chroni komórki nowotworowe przed RFT w dwójaki sposób. Po pierwsze, dostarcza NADPH — czynnika redukcyjnego potrzebnego do uaktywnienia enzymów antyoksydacyjnych i do powtórzenia obiegu antyoksydacyjnego glutationu. Po drugie, szlak pentozowy reguluje ekspresję genów ułatwiających adaptację do stresu oksydacyjnego.

Anastasiou i wsp. [19, 24] ustalili, że aktywacja szlaku pentozowego i jego aktywności antyoksydacyjnej jest konieczna do wzrostu komórek nowotworowych (ryc. 2). Autorzy eksperymentalnie dowiedli, że akumulacja RFT powoduje uszkodzenia oksydacyjne i spowalnia proliferację komórek nowotworowych rosnących *in vitro* i przeszczepionych myszom. Te wyniki sugerują, że indukując *efekt Warburga*, promuje się wzrost nowotworu poprzez aktywację szlaku pentozowego. To odkrycie ma duże znaczenie dla zrozumienia energetycznej równowagi w czasie rozwoju nowotworu. Anastasiou i wsp. [19] pokazali, że aktywacja szlaku pentozowego odgrywa kluczową rolę w metabolizmie komórek nowotworowych i ułatwia wzrost nowotworu w wyniku ograniczenia akumulacji RFT i stresu oksydacyjnego. To sugeruje, że utrzymywanie równowagi reakcji redoks jest ważniejsze dla wzrostu nowotworu niż poziom energii czy biosynteza [12]. Kontrola wewnątrzkomórkowego poziomu RFT jest zatem krytyczna dla przeżycia komórek nowotworowych. Znaczny wzrost RFT w komórkach nowotworowych powoduje zahamowanie aktywności

glikolizy oraz synteza pentoz [19, 21]. Metabolity tego szlaku są wspólne z metabolitami glikolizy, dzięki czemu zwiększa się ilość glukozy utlenianej w procesie oddychania. W powyższych przemianach decydującą rolę odgrywa PKM2 [22, 23]. W nowotworach poziom tego enzymu — podobnie jak innych enzymów metabolicznych — wzrasta. Białko to ma unikalną rolę regulacyjną, ponieważ zmniejszenie jego katalitycznej aktywności jest łączone z progresją guza i rozwojem *efektu Warburga*. Niska aktywność kinazy pirogronianowej w komórkach nowotworowych prowadzi do akumulacji jej substratu — PEP [22], co w konsekwencji hamuje enzym glikolityczny — izomerazę triozofosforanową (Tpi) — i prowadzi do aktywacji szlaku alternatywnego do glikolizy — cyklu pentozowego (ryc. 3). Wzrost aktywności tej ścieżki chroni komórki nowotworowe przed RFT w dwójaki sposób. Po pierwsze, dostarcza NADPH — czynnika redukcyjnego potrzebnego do uaktywnienia enzymów antyoksydacyjnych i do powtórzenia obiegu antyoksydacyjnego glutationu. Po drugie, szlak pentozowy reguluje ekspresję genów ułatwiających adaptację do stresu oksydacyjnego.



**Rycina 3.** Synchronizacja reakcji redoks i metabolizmu komórki przez kinazę pirogronianową (PK). Niska aktywność PKM2 wpływa na akumulację fosfoenolpirogronianu (PEP), następstwem czego jest stymulacja szlaku pentozowego. Powoduje to hamowanie aktywności enzymu glikolitycznego — izomerazy triozofosforanowej (Tpi), co z kolei powoduje wzrost metabolizmu antyoksydacyjnego i zapobiega akumulacji reaktywnych form tlenu (RFT) podczas oddychania



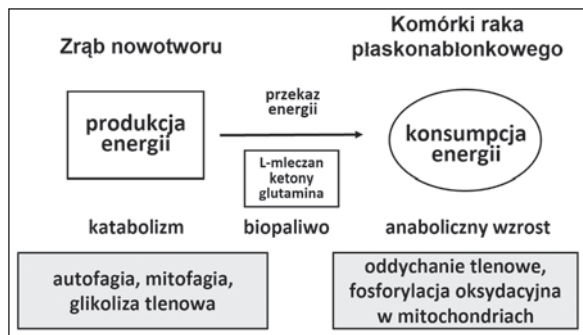
**Rycina 4.** Odwrotny efekt Warburga — glikoliza tlenowa zachodzi głównie w fibroblastach zrębu nowotworu, a nie w komórkach nowotworowych. Schemat przedstawia model metabolicznej współpracy pomiędzy aktywowanymi fibroblastami zrębu nowotworu a komórkami nowotworowymi pochodzenia nabłonkowego. Wysokoenergetyczne związki (pirogonian, mleczan) wydzielane przez fibroblasty mogą wchodzić do cyklu Krebsa w komórkach nowotworowych, dzięki czemu zachodzi w mitochondriach tlenowy metabolizm promujący wzrost nowotworu. MCT — transportery jednowęglowe

enzymu glikolitycznego — PKM2 i skierowanie glukozy na szlak pentozowy [19, 20].

Głównym celem wzmoczonej glikolizy w proliferujących komórkach może być dostarczanie glikolitycznych intermediatów niezbędnych do podtrzymania biosyntezy [4, 11, 24, 25]. Onkogenne ścieżki sygnalizacyjne prowadzą do zmian w proteomie raka, powodując pobieranie środków odżywczych i zmiany procesów metabolicznych, które promują wykorzystanie ich do procesów anabolicznych. Zwiększenie syntezy tłuszczów jest krytyczne dla podtrzymania proliferacji, ponieważ są one niezbędne do budowy błon komórkowych. Glutamina też może przyczyniać się do biosyntezy kwasów tłuszczowych, służyć jako prekursor dla innych aminokwasów, dostarczać atomów azotu do syntezy zasad nukleotydów i deoksynukleotydów [24]. Utworzony w tym szlaku 5-węglowy cukier może być wykorzystywany do syntezy nukleotydów budujących RNA oraz DNA.

### Choroba nowotworowa chorobą „pasożytniczą”?

Niedawno przedstawiono nową hipotezę dotyczącą oddychania komórek nowotworowych [8, 9]. Autorzy zwrócili uwagę na współpracę aktywowanych fibroblastów podścieliska z komórkami nowotworowymi w procesach metabolicznych. Model zakłada przesunięcie metabolizmu na korzyść glikolizy w aktywowanych fibroblastach, natomiast przewagę oddychania tlenowego w komórkach nowotworowych (ryc. 4). Ten rodzaj zależności autorzy nazwali *odwrotnym efektem Warburga* [8], ponieważ glikoliza tlenowa zachodzi głównie w fibroblastach zrębu, a nie w komórkach nowotworowych [26]. Porównano chorobę nowotworową do choroby pasożytniczej. Autorzy wykazali, że komórki



**Rycina 5.** Metaboliczne zależności między komórkami nowotworowymi a komórkami zrębu nowotworu. Pod wpływem wydzielanego przez komórki nowotworowe nadtlenu wodoru dochodzi do stresu oksydacyjnego i glikolizy tlenowej w komórkach zrębu nowotworu. Aktywowane fibroblasty wydzielają związki chemiczne (*parakryjne onkometabolity*) napędzające tlenowy metabolizm w mitochondriach komórek nowotworowych i mogące służyć do budowy makrocząsteczek komórki

zmienione nowotworowo zachowują się jak metaboliczne pasożyty. Wywołują stres oksydacyjny (produkują RFT), zmuszając fibroblasty podścieliska do przeprowadzania procesów katabolicznych, takich jak autofagia, mitofagia czy fermentacja mlekowa, aby następnie wykorzystać wytworzone w ten sposób związki (mleczan, ketony, glutamina) i energię w procesach anabolicznych i oddychaniu tlenowym, co z kolei umożliwia im wzrost i rozwój (ryc. 5) [9, 23, 26]. W przekazywaniu związków biorą udział transportery błonowe jednowęglowych związków organicznych (MTC), a geny kodujące te transportery (np. reduktazę azotanową, syntazę asparaginową, syntetazę glutaminową) aktywowane są przez cukry. W tym układzie komórki nowotworowe można by nazwać *pasożytem*, natomiast fibroblasty podścieliska — *gospodarzem*.

Autorzy wykazali, że w podścielisku agresywnych nowotworów piersi zachodzą procesy autofagowe, degradacja mitochondriów oraz fermentacja mlekowa, podczas gdy w epithelialnych komórkach nowotworowych przebiega fosforylacja oksydacyjna, co zostało udowodnione dzięki wykryciu aktywnych kompleksów enzymatycznych łańcucha oddechowego: dehydrogenazy NADH, dehydrogenazy bursztynianowej oraz oksydazy cytochromu C. Zjawisko nazwano *odwrotnym efektem Warburga* [9, 26].

Przeprowadzono również analizę profilu ekspresji genów w komórkach nowotworowych oraz fibroblastach podścieliska. Przeanalizowano ponad 2000 przypadków raka piersi (zarówno z ekspresją jak i bez ekspresji receptora estrogenowego, ER) oraz ponad 100 zdrowych tkanek. Na tej podstawie wybrano 38 genów związanych z fosforylacją oksydacyjną i aktywnością mitochondriów, które ulegają znacznie wyższej ekspresji w komórkach nowotworowych w porównaniu z komórkami zrębu. Ekspresja wytypowanych 38 genów była istotnie wyższa w tkance raka piersi w po-

równaniu z tkanką zdrową. Autorzy wykazali, że wysoka ekspresja tych genów u chorych korelowała z niższym prawdopodobieństwem 10-letniego przeżycia chorych, szczególnie wyraźnie w przypadku nowotworów ER-ujemnych.

Reasumując, fibroblasty podścieliska są odpowiedzialne za wytwarzanie energii. Dzięki zachodzącym w nich licznym procesom katabolicznym (autofagia, mitofagia, fermentacja mlekowa) powstają wysokoenergetyczne związki, takie jak mleczan, ketony czy glutamina, które są biopaliwem chętnie wykorzystywanym przez komórki nowotworowe. Komórki te, dzięki wytworzeniu wspomnianych substratów, mogą przeprowadzać liczne procesy anaboliczne oraz wytwarzać duże ilości ATP w procesie oddychania tlenowego. Umożliwia to wzrost i rozwój, a zatem — progresję nowotworu.

### Podsumowanie

Wyniki ostatnich badań dowodzą, że prowadzenie glikolizy tlenowej przez komórki nowotworowe jest bardziej korzystne dla rozwoju nowotworu ze względu na dużą szybkość tego procesu, co umożliwia dostarczenie większej niż w oddychaniu tlenowym ilości metabolitów, które mogą być wykorzystane do reakcji biosyntetycznych oraz wpływać na zmiany sygnalizacji komórkowej i blokowanie różnicowania komórek [5, 26]. Można je uznać za parakrynnne onko-metabolity [26]. Glikoliza tlenowa umożliwia również komórkom nowotworowym uniknięcie stresu oksydacyjnego [4, 12, 19].

Sugeruje się wykorzystanie roli izoenzymu PKM2 i roli mikrośrodowiska nowotworu w terapii przeciwnowotworowej. Izoenzym PKM2 jest również rozpatrywany jako potencjalny marker nowotworowy, który może być wykorzystany w diagnozowaniu i monitorowaniu nowotworów. Choć słuszność hipotezy dotyczącej odwrotnego efektu Warburga nie została potwierdzona w innych niż rak piersi nowotworach, wskazano już na korzyści terapeutyczne jakie mogłoby mieć zastosowanie inhibitorów glikolizy, autofagii i/lub aktywności mitotycznej, np. metforminy [23]. Transporter MCT4 jest sugerowany jako potencjalny biomarker do identyfikacji chorych o dużym ryzyku wznowy i przerzutów — potencjalnej tarczy dla leków lub inhibitorów tego transportera (zatwierdzonych przez FDA) [26].

### Prof. dr hab. n. med. Anna Gasińska

Zakład Radiobiologii Klinicznej  
Centrum Onkologii  
Oddział w Krakowie  
ul. Garncarska 11, 31-115 Kraków  
e-mail: z5gasins@cyf-kr.edu.pl

Otrzymało: 18 czerwca 2012 r.

Przyjęto do druku: 12 września 2012 r.

### Piśmiennictwo

1. Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol* 1927; 8: 519–530.
2. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; 123: 309–314.
3. Bellance N, Lestienne P, Rossignol R. Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. *Front Biosci* 2009; 14: 4015–4034.
4. Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011; 27: 441–464.
5. Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even Warburg did not anticipate. *Cancer Cell* 2012; 21: 297–308.
6. Mazurek S. Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43: 969–980.
7. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH i wsp. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 2008; 452: 230–233.
8. Bonuccelli G, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R i wsp. The reverse Warburg effect: glycolysis inhibitors prevent the tumor promoting effects of caveolin-1 deficient cancer associated fibroblasts. *Cell Cycle* 2010; 9: 1960–1971.
9. Whitaker-Menezes D, Martinez-Outschoorn UE, Flomenberg N i wsp. Hyperactivation of oxidative mitochondrial metabolism in epithelial cancer cells in situ: visualizing the therapeutic effects of metformin in tumor tissue. *Cell Cycle* 2011; 10: 4047–4064.
10. Mohyeldin A, Garzon-Muvdi T, Quinones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* 2010; 7: 150–161.
11. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; 324: 1029–1033.
12. Gruning NM, Ralser M. Cancer: Sacrifice for survival. *Nature* 2011; 480: 190–191.
13. Suda T, Takubo T, Semenza GL. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell* 2011; 9: 298–310.
14. Luo W, Hu H, Chang i wsp. Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for Hypoxia-Inducible Factor 1. *Cell* 2011; 145: 732–744.
15. Bluemlein K, Gruning NM, Feichtinger RG i wsp. No evidence for a shift in pyruvate kinase PKM1 to PKM2 expression during tumorigenesis. *Oncotarget* 2011; 2: 393–400.
16. Balliet RM, Capparelli C, Guido C i wsp. Mitochondrial oxidative stress in cancer-associated fibroblasts drives lactate production, promoting breast cancer tumor growth: understanding the aging and cancer connection. *Cell Cycle* 2011; 10: 4065–4073.
17. Mazurek S, Boschek CB, Hugo F i wsp. Pyruvate kinase M2 and its role in tumor growth and spreading. *Semi Cancer Biol* 2005; 15: 300–308.
18. Yang W, Xia Y, Ji H i wsp. Nuclear PKM2 regulates  $\beta$ -catenin transactivation upon EGFR activation. *Nature* 2011; 478, 118–122.
19. Anastasiou D, Poulogiannis G, Asara JM i wsp. Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses. *Science* 2011; 334: 1278–1283.
20. Hamanaka RB, Chandel NS. Warburg effect and redox balance. *Science* 2011; 334: 1219–1220.
21. Hatzivassiliou G, Zhao F, Bauer DE i wsp. ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell* 2005; 8: 311–321.
22. Gruning NM, Rinnerthaler M, Bluemlein K i wsp. Pyruvate kinase triggers a metabolic loop that controls redox metabolism in respiring cells. *Cell Metab* 2011; 14: 415–427.
23. Chiavarina B, Whitaker-Menezes D, Martinez-Outschoorn UE i wsp. Pyruvate kinase expression (PKM1 and PKM2) in cancer-associated fibroblasts drives stromal nutrient production and tumor growth. *Cancer Biol & Ther* 2012; 12: 1101–1113.
24. Anastasiou D, Cantley LC. Breathless cancer cells get fat on glutamine. *Cell Res* 2012; 1–4.
25. Metallo CM, Gameiro PA, Bell EL i wsp. Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature* 2011; 481: 380–384.
26. Witkiewicz A, Whitaker-Menezes D, Dasgupta A i wsp. Using the “reverse Warburg effect” to identify high-risk breast cancer patients. Stromal MCT4 predicts poor clinical outcome in triple-negative breast cancers. *Cell Cycle* 2012; 11: 1108–1117.