

Received: 14.07.2017  
Accepted: 24.01.2018  
Published: 29.05.2018

## Wpływ tlenu na efekt Warburga: czy w komórkach nowotworowych mleczań powstaje tylko z glukozy?

### Influence of oxygen on the Warburg effect: do cancer cells produce lactate only from glucose?

Wojciech Graboń, Dagmara Otto-Ślusarczyk, Anna Barańczyk-Kuźma

Katedra i Zakład Biochemii, I Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny

#### Streszczenie

Wspólną cechą wielu nowotworów jest zjawisko nazywane efektem Warburga – wytwarzanie dużych ilości mleczań w warunkach dostępności tlenu. Powszechnie przyjmuje się, że mleczań jest syntetyzowany z glukozy, stąd inne określenie tego zjawiska – glikoliza tlenowa (aerobic glycolysis). Hipoksja często występująca w litych guzach nowotworowych powoduje wzrost aktywności czynnika transkrypcyjnego HIF-1, który pobudza syntezę mleczań przez aktywację transkrypcji genów transporterów glukozy i enzymów glikolizy z jednoczesnym hamowaniem mitochondrialnego metabolizmu pirogronianu. Jednak w warunkach normoksji, gdy czynnik HIF-1 jest nieaktywny, mleczań jest końcowym produktem nie tylko glikolizy, lecz także glutaminolizy. Oba szlaki są aktywowane przez czynnik transkrypcyjny c-myc. Glutaminoliza, szlak mitochondrialny przebiegający z udziałem enzymów cyklu Krebsa, dostarcza komórce energii, a związki pośrednie (L-glutaminian, L-asparaginian, acetylo-CoA) są substratami do syntezy kwasów nukleinowych, białek i lipidów. Następnie cytoplazmatyczna oś szczawiooctan-jabłczan-pirogronian-mleczań dostarcza kofaktorów oksydoredukcyjnych - NADPH do syntezy lipidów i DNA oraz dla układów antyoksydacyjnych komórki, jak również NAD<sup>+</sup> niezbędnego do wydajnego przebiegu glikolizy, co zwiększa ilość mleczań z glukozy w normoksji. Tak więc, tlen, jako aktywator cyklu Krebsa, zwiększa syntezę mleczań jako końcowego produktu glutaminolizy, a także sprzyja syntezie mleczań w glikolizie. Podsumowując, efekt Warburga jest wynikiem pobudzanego przez tlen intensywnego wytwarzania mleczań w szlakach glikolizy i glutaminolizy. Zwiększona synteza mleczań w normoksji nie jest zatem wynikiem prostego przestawienia na metabolizm pozamitochondrialny, lecz przejawem regulowanej przez czynniki transkrypcyjne adaptacji umożliwiającej komórkom nowotworowym pozyskiwanie energii oraz składników odżywczych niezbędnych do wzrostu i proliferacji.

#### Słowa kluczowe:

efekt Warburga • glikoliza • glutaminoliza • hipoksja • normoksja • mleczań • nowotwór

#### Summary

The common characteristics of many tumors is phenomenon termed the Warburg effect – the production of abundant amounts of lactate in the presence of sufficient oxygen. It is commonly accepted that lactate is synthesized from glucose; hence, the other term for this phenomenon is aerobic glycolysis. Hypoxia, frequently observed in solid tumors, results in an increased HIF 1 transcription factor activity, which stimulates lactate synthesis by activating the transcription of glucose transporters and glycolytic enzymes genes, while inhibiting mitochondrial

pyruvate metabolism. However, under normoxic conditions, when the HIF-1 factor is inactive, the lactate is the product not only of glycolysis, but also of glutaminolysis. Both pathways are activated by the c-myc transcription factor. Glutaminolysis, the mitochondrial pathway involving Krebs cycle enzymes, provides energy to the cell and the pathway intermediates (L-glutamate, L-aspartate, acetyl CoA) are substrates for the synthesis of nucleic acids, proteins and lipids. Subsequently, the cytoplasmic oxaloacetate-malate-pyruvate-lactate axis provides redox cofactors - NADPH for lipid and DNA synthesis and for cellular antioxidant systems as well as NAD<sup>+</sup> necessary for efficient glycolysis resulting in increased lactate synthesis from glucose at normoxia. Thus, oxygen as Krebs cycle activator enhances lactate synthesis as the end product of glutaminolysis as well as promotes glycolytic lactate synthesis. In conclusion, the Warburg effect is the result of oxygen-induced extensive lactate production in both glycolysis and glutaminolysis pathways. Thus, an increased lactate synthesis at normoxia is just not the result of the cellular shift to extramitochondrial metabolism, but a manifestation of transcriptionally regulated adaptive response, allowing the cancer cells to acquire the energy and nutrients necessary for growth and proliferation.

**Keywords:** Warburg effect • glycolysis • glutaminolysis • hypoxia • normoxia • lactate • cancer

**GICID:** 01.3001.0012.0684  
**DOI:** 10.5604/01.3001.0012.0684  
**Word count:** –  
**Tables:** –  
**References:** –

**Adres autora:** lek. Wojciech Graboń, Katedra i Zakład Biochemii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa; e-mail: wgrabon@wum.edu.pl

**Wykaz skrótów:** **ACO1** – cytoplazmatyczna izoforma cis-akonitazy, **ACO2** – mitochondrialna izoforma cis-akonitazy, **ASCT2** – transporter L-glutaminy 2, **AST2** – mitochondrialna izoforma aminotransferazy asparaginianowej, **c-myc** – czynnik transkrypcyjny c-myc, **COX** – oksydaza cytochromowa, **COX4-1**, **COX4-2** – izoformy oksydazy cytochromowej, **GLS1** – mitochondrialna izoforma glutaminazy, **GLUD1** – mitochondrialna izoforma dehydrogenazy glutaminianowej, **GLUT1**, **GLUT3** – transporter glukozy 1, 3, **HIF-1** – czynnik transkrypcyjny indukowany hipoksją, **HK** – heksokinaza, **HO-1** – oksygenaza hemowa 1, **IDH1**, **IDH2** – izoformy dehydrogenazy izocytrynianowej 1, 2, **iNOS** – indukowana syntaza tlenu azotu, **L-Asp** – pozytronowainian, **LDHA** – dehydrogenaza mleczanowa A, **L-Gln** – L-glutamina, **L-Glu** – L-glutaminian, **M2-PK** – izoforma M2 kinazy pirogronianowej, **MCT4** – transporter mleczanu 4, **MDH1** – cytoplazmatyczna dehydrogenaza jabłczanowa, **ME1** – cytoplazmatyczny enzym jabłczanowy, **PDH** – dehydrogenaza pirogronianowa, **PDK1** – kinaza dehydrogenazy pirogronianowej, **PET** – pozytonowa tomografia emisyjna, **RFT** – reaktywne formy tlenu, **SN2** – transporter L-glutaminy 2, **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonna naczyńniowego.

## WSTĘP

Ponad 90 lat temu, Otto Warburg stwierdził, że tkanki nowotworowe pobierają dużo glukozy, która nawet w warunkach dużej dostępności tlenu jest przekształcana głównie w mleczan, natomiast nie jest wykorzystywana do syntezy ATP w mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej [67]. To występujące w szybko dzielących się komórkach zjawisko zostało nazwane efektem Warburga. Warburg łączył zaobserwowany efekt z uszkodzeniami mitochondriów. Obecnie wiadomo, że mitochondria w komórkach nowotworowych działają prawidłowo, natomiast zmieniony jest ich metabolizm. Coraz większa liczba danych wskazuje, że efekt Warburga jest

wynikiem złożonego mechanizmu przeprogramowania komórki w celu osiągnięcia stanu umożliwiającego wzrost i proliferację lub przeżycie w warunkach różnej dostępności tlenu i składników odżywczych.

Intensywne pobieranie glukozy przez komórki nowotworowe jest wykorzystywane w badaniu PET (pozytonowa tomografia emisyjna) umożliwiającym wykrywanie ognisk nowotworowych na podstawie zwiększonego wychwytu znakowanej fluorem deoksyglukozy (18FDG). Zwiększony wychwyt 18FDG jest wynikiem nasilonej glikolizy w tkankach nowotworowych przebiegającej zarówno w normoksji, jak i hipoksji tkankowej [28]. Pozwala to na ich odróżnienie od nych tkanek praw-

dłowych, ale nie pozwala na wykrycie ognisk hipoksji w tkance nowotworowej [10]. Jest jednak pośrednim potwierdzeniem zachowanego intensywnego poboru i metabolizmu glukozy w komórkach nowotworowych, mimo jej zmniejszonego stężenia w środowisku guza w hipoksji [8, 17].

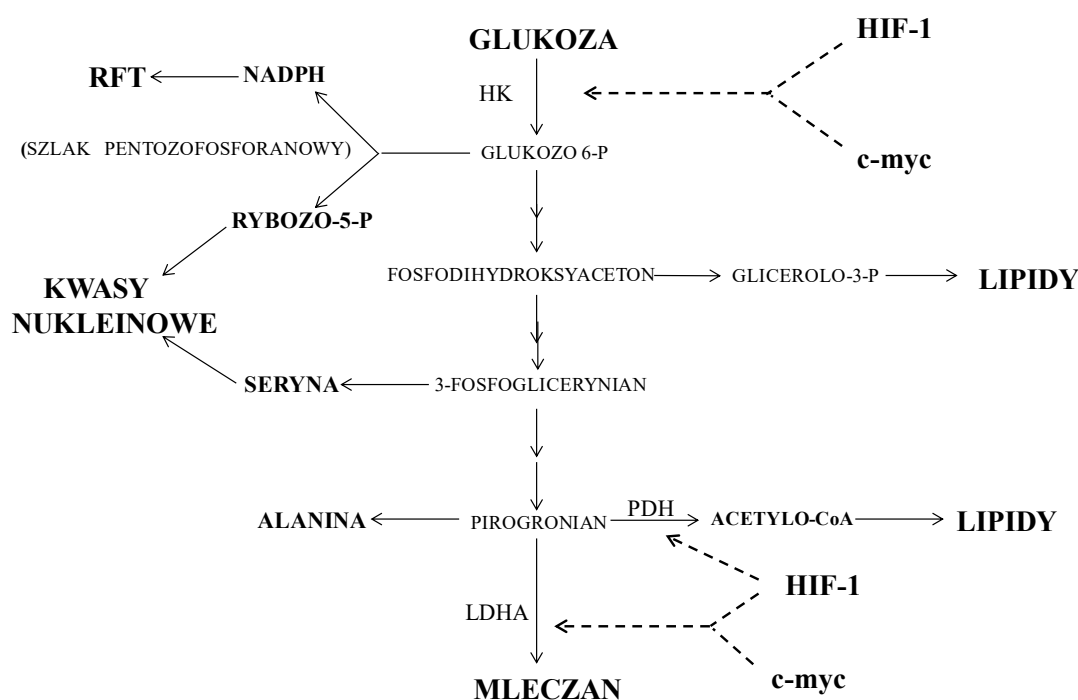
Należy także uwzględnić, pomijany w wielu pracach fakt, że synteza mleczanu z glukozy jest nieproporcjonalnie mniejsza w stosunku do jej pobierania przez komórki nowotworowe. Maksymalny współczynnik stechiometryczny mleczan/glukoza wynosi 2:1. Jednak w warunkach *in vivo*, nie przekracza wartości 1,7, gdyż glukoza oraz związki pośrednie glikolizy są zużywane do syntezy niezbędnych składników budulcowych komórki, takich jak kwasy nukleinowe (synteza L-seryny w bocznym szlaku glikolizy, szlak pentozofosforanowy) oraz triacyloglicerole (synteza glicerolo-3-fosforanu z glukozy oraz kwasów tłuszczowych z acetylo-CoA) (ryc. 1).

### CZNNIK TRANSKRYPCYJNY HIF-1 ZWIĘKSZA SYNTEZĘ MLECZANU Z GLUKOZY W HIPOKSJI

Zmiany stężenia tlenu są cechą charakterystyczną litych guzów nowotworowych. Są spowodowane szybką proliferacją komórek z jednoczesnym wadliwym i niedostatecznym wytwarzaniem nowych naczyń krwionośnych (angiogeneza) zaopatrujących tkankę nowotworową [25, 40]. Występowanie hipoksji jest związane z gorszym

rokowaniem oraz większą opornością nowotworu na leczenie [6, 7, 32]. Spadek stężenia tlenu poniżej 5% powoduje wzrost aktywności HIF-1, którego podjednostka alfa przestaje być degradowana w proteasomach, a następuje zwiększenie jej ekspresji [33, 56]. Czynniki HIF-1 indukuje ekspresję genów białek adaptujących metabolizm komórki do zmniejszonej podaży tlenu. Są wśród nich transportery glukozy GLUT1 i 3, enzymy glikolityczne (w tym izoformy heksokinazy - HK, izoforma M2 kinazy pirogronianowej), izoforma dehydrogenazy mleczanowej (LDHA) uczestnicząca w syntezie mleczanu oraz transporter mleczanu MCT4 [15, 44, 57, 63] (ryc. 1).

Bardzo ważną rolę pełnią przez HIF-1 w hipoksji jest zmniejszanie wytwarzania acetylo-CoA z powstającego w glikolizie pirogronianu (ryc. 1). Odbywa się to przez aktywację kinazy dehydrogenazy pirogronianowej (PDK1), która hamując dehydrogenazę pirogronianową (PDH) zwiększa podaż pirogronianu do syntezy mleczanu [34]. Niedobór acetylo-CoA zmniejsza aktywność cyklu Krebsa w celu kompensacyjnego ograniczenia powstawania reaktywnych form tlenu (RFT) w łańcuchu oddechowym, gdyż w hipoksji wytwarzanie RFT przez kompleksy I i III łańcucha zwiększa się wskutek zmniejszonej podaży tlenu jako substratu kompleksu IV [13, 55, 60]. HIF-1, który jest stabilizowany przez RFT jest czynnikiem adaptującym aktywność łańcucha oddechowego do warunków hipoksji [14]. Odbywa się to przez zmianę ekspresji podjednostki 4 kompleksu IV łańcucha



Ryc. 1. Glikoliza – udział w szlakach syntezy

oddechowego – oksydazy cytochromowej (COX). HIF-1 indukuje ekspresję izoformy COX4-2 o większym powinowactwie do tlenu z jednoczesną proteolityczną degradacją izoformy COX4-1 [9, 27]. Skutkiem takiego działania HIF-1 jest optymalne utrzymanie mitochondrialnej syntezy ATP z jednoczesnym ograniczaniem wytwarzania RFT w łańcuchu oddechowym.

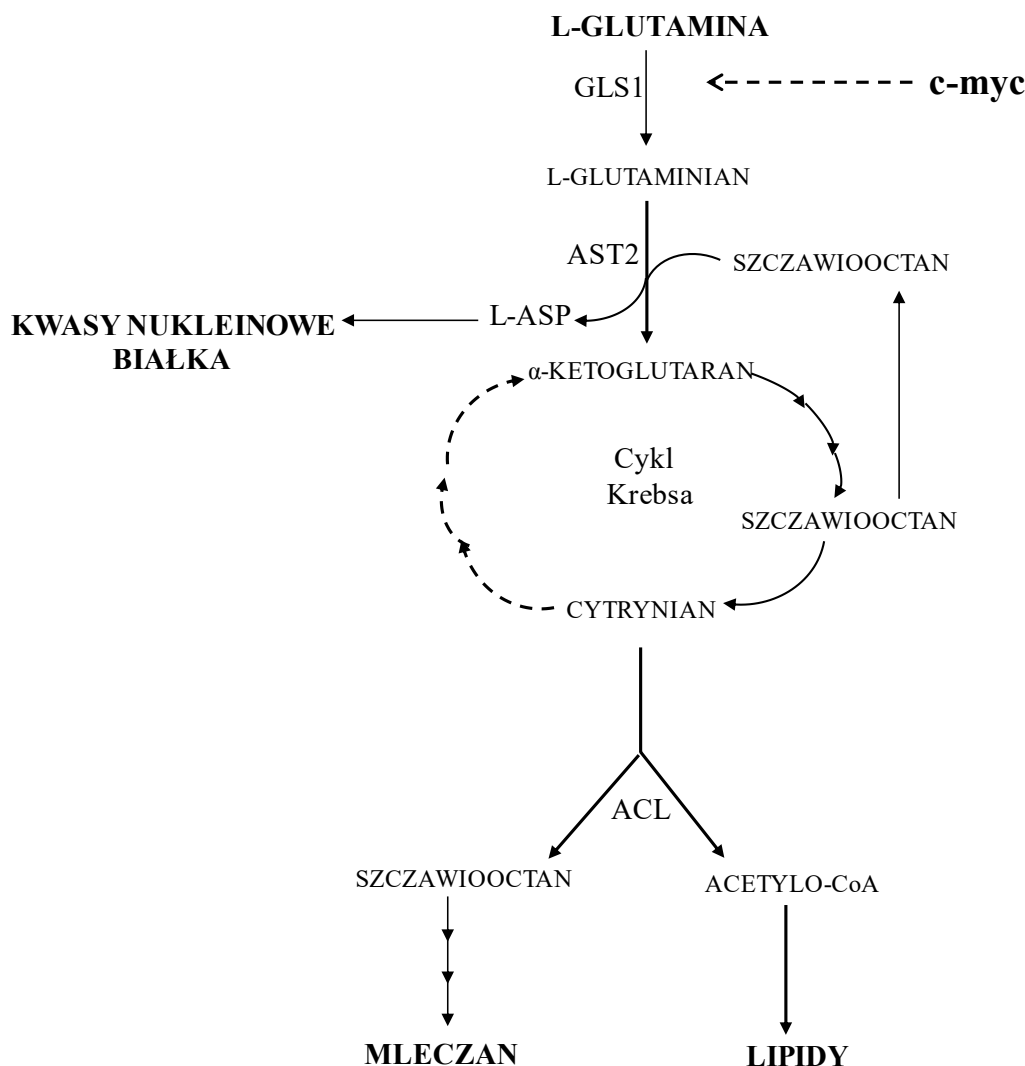
Innym mechanizmem ograniczenia mitochondrialnej syntezy RFT przez czynnik HIF-1 jest omówione niżej jego działanie hamujące ekspresję czynnika transkrypcyjnego c-myc.

Tak więc hipoksja sprzyja powstawaniu endogennych RFT w łańcuchu oddechowym, choć to właśnie zmniejszona dostępność tlenu jest przyczyną oporności nowotworów o litej budowie na radioterapię [22, 64, 66]. W badaniach klinicznych wykazano, że komórki nowotworowe w warunkach

hipoksji są bardziej odporne na radioterapię, gdyż zmniejszony dostęp tlenu ogranicza powstawanie egzogennych RFT pod wpływem promieniowania jonizującego [50]. Ponadto, syntetyzowany w dużych ilościach, mleczan wykazuje działanie antyoksydacyjne [31].

Inną ważną rolę czynnika HIF-1 jest przywrócenie odpowiedniego zaopatrzenia komórek w tlen oraz substancje odżywcze i budulcowe. Odbywa się to dzięki indukcji transkrypcji genów białek związanych z angiogenezą – czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), indukowanej izoformy syntazy tlenu azotu (iNOS) i oksygenazy hemowej 1 (HO-1) [11, 26, 38, 53].

Ważne jest to, że niedobór tlenu nie jest czynnikiem ograniczającym proliferację komórek nowotworowych. Badania przeprowadzone w naszym zespole wykazały, że komórki raka jelita grubego proliferują szybciej w 1%



Ryc. 2. Glutaminoliza klasyczna – rola w szlakach syntezy (wg [3], zmodyfikowano)

hipoksji niż w 10% fizjologicznej normoksji tkankowej przy zapewnionej podaży glukozy, glutaminy i aminokwasów egzogennych [30]. W środowisku guza nowotworowego hipoksji towarzyszy zmniejszone stężenie związków budulcowych i energetycznych [65]. Można zatem wnioskować, że niskie stężenie tlenu jest raczej sygnałem dostosowania metabolizmu komórki do jednocześnie występującego niedoboru substancji energetycznych i budulcowych. Proliferacja zostaje zahamowana dopiero w warunkach całkowitego braku tlenu (anoksja), gdy jedynym źródłem energii staje się glikoliza. W tym aspekcie, angiogeneza jest procesem mającym na celu przywrócenie zaopatrzenia nie tylko w tlen, lecz także w wyżej wymienione substancje odżywcze, a także usuwanie ze środowiska mleczanu, który w wysokim stężeniu hamuje proliferację komórek nowotworowych [22, 43].

Wyżej omówione przemiany wskazują, że w hipoksji mleczan powstaje z glukozy nie tylko w wyniku niedoboru tlenu, lecz również wskutek indukowanych hipoksją zmian metabolicznych mających na celu ograniczenie syntezy RFT w łańcuchu oddechowym.

#### CZNNIK TRANSKRYPCYJNY C-MYC ODPOWIADA ZA EFEKT WARBURGA PRZEZ AKTYWACJĘ SZLAKÓW GLIKOLIZY I GLUTAMINOLIZY W NORMOKSJI

Białko c-myc, produkt genu *C-MYC*, jest czynnikiem transkrypcyjnym uczestniczącym w wielu procesach związanych ze wzrostem i proliferacją komórek [19, 41, 49, 51]. Zwiększona ekspresja genu i poziomu białka c-myc występuje w około 30% nowotworów u człowieka, w tym w większości nowotworów bardzo często występujących, takich jak rak sutki, jelita grubego i gruczołu krokowego. Nadekspresja genu *C-MYC* w różnych nowotworach jest związana ze złym rokowaniem [1, 4, 61].

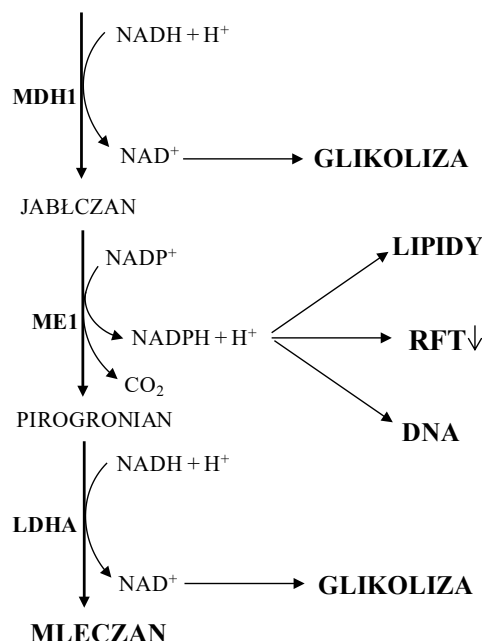
#### C-MYC ZWIĘKSZA SYNTĘZĘ MLECZANU Z GLUKOZY W NORMOKSJI

W komórkach nowotworowych glikoliza jest szlakiem wykazującym bardzo dużą aktywność w normoksji tkankowej (w stężeniach tlenu przekraczających 5%), mimo braku aktywności czynnika HIF-1 [32]. Obecnie wiadomo, że c-myc jest czynnikiem transkrypcyjnym bezpośrednio aktywującym geny enzymów glikolitycznych, takich jak heksokinaza-2, fosfofruktokinaza-1 i enolaza-1, a także transportera GLUT1 [20, 52]. Ponadto c-myc jest aktywatorem ekspresji LDHA w normoksji [58]. Powoduje to utrzymanie syntezy mleczanu, mimo zmniejszonej podaży pirogronianu, który w tych warunkach jest substratem niehamowanej przez PDK1 dehydrogenazy pirogronianowej (ryc.1, 4).

#### C-MYC ZWIĘKSZA SYNTĘZĘ MLECZANU Z GLUTAMINY W NORMOKSJI

W komórkach szybko dzielących, w tym nowotworowych, glutaminoliza jest głównym szlakiem przemian L-glutaminy (L-Gln) w normoksji [47, 70]. Szlak ten

#### SZCZAWIOOCTAN

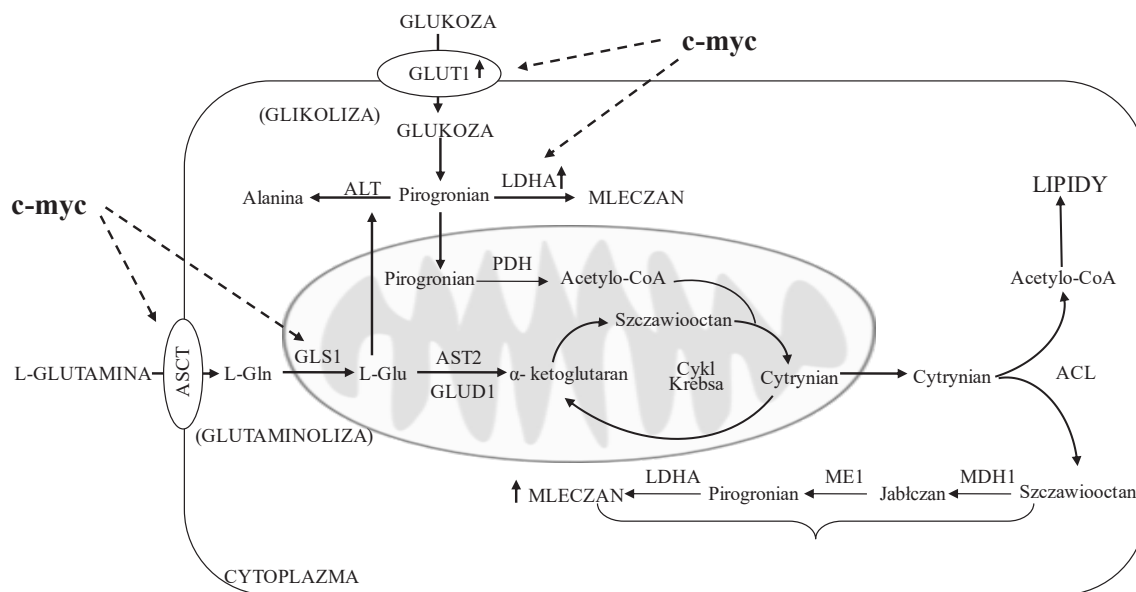


Ryc. 3. Rola osi szczawiooctan-jabłczan-pirogronian-mleczan w metabolizmie komórki nowotworowej (wg [59] zmodyfikowano)

dostarcza zarówno energii, jak i substratów do syntezy kwasów nukleinowych, białek i lipidów, a więc związków niezbędnych do proliferacji [3, 21] (ryc. 2). Stwierdzono, że niektóre nowotwory występujące u człowieka pobierają tak dużo L-Gln, że obniża to stężenie tego aminokwasu w osoczu [16, 35].

Glutaminoliza przebiega w mitochondriach z udziałem części enzymów cyklu Krebsa. Pierwszą reakcją jest przekształcenie L-Gln do L-Glu z udziałem glutaminazy, enzymu, którego aktywność wzrasta w wielu typach nowotworów [42, 54, 62]. Następnie L-Glu jest przekształcany przez dehydrogenazę glutaminianową 1 (GLUD1) i aminotransferazę asparaginianową 2 (AST2) do  $\alpha$ -ketoglutaranu, który ulega oksydacyjnej dekarboksylacji w cyklu Krebsa [2, 36]. AST2 odgrywa w tym szlaku podwójną rolę, gdyż syntetyzuje zarówno związek pośredni -  $\alpha$ -ketoglutaran, jak i produkt glutaminolizy - L-Asp który po przeniesieniu do cytoplazmy jest wykorzystywany do syntezy puryn i pirymidyn.

Inne enzymy glutaminolizy - dehydrogenaza alfa-ketoglutaranowa, syntetaza bursztynnylo-CoA, dehydrogenaza bursztynianowa, hydratata fumaranowa, dehydrogenaza jabłczanowa i syntaza cytrynianowa są enzymami cyklu Krebsa. W normoksji synteza cytrynianu przebiega wydajnie również dzięki dostarczaniu acetylo-CoA przez aktywną PDH. Po przeniesieniu do cytoplazmy cytrynian staje się substratem liazy ATP-cytrynianowej odtwarzającej acetylo-CoA oraz szczawiooctan (ryc. 2).



**Ryc. 4.** Wpływ czynnika transkrypcyjnego c-myc na syntezę mleczanu z glukozy i glutaminy w normoksji

Powstający szczawiooctan staje się substratem do syntezy mleczanu w osi szczawiooctan-jabłczan-pirogronian-mleczan (ryc. 3). Rolą enzymów osi jest odtwarzanie  $NAD^+$  w cytoplazmie umożliwiające wydajny przebieg glikolizy (reakcje katalizowane przez dehydrogenazę jabłczanową - MDH1 i dehydrogenazę mleczanową - LDHA) oraz powstawanie NADPH (reakcja katalizowana przez enzym jabłczanowy - ME1) niezbędnego do syntezy lipidów i DNA oraz dla układów antyoksydacyjnych komórki.

W komórkach prawidłowych NADPH oraz większość rybozo-5-fosforanu niezbędnego do syntezy DNA powstaje w części oksydacyjnej szlaku pentozofosforanowego, natomiast w komórkach szybko dzielących się, głównym źródłem rybozo-5-fosforanu jest część nieoksydacyjna szlaku, w której NADPH nie powstaje [5, 12, 37]. Dlatego, w komórkach nowotworowych oś szczawiooctan  $\rightarrow$  mleczan staje się ważnym źródłem tego kofaktora [59].

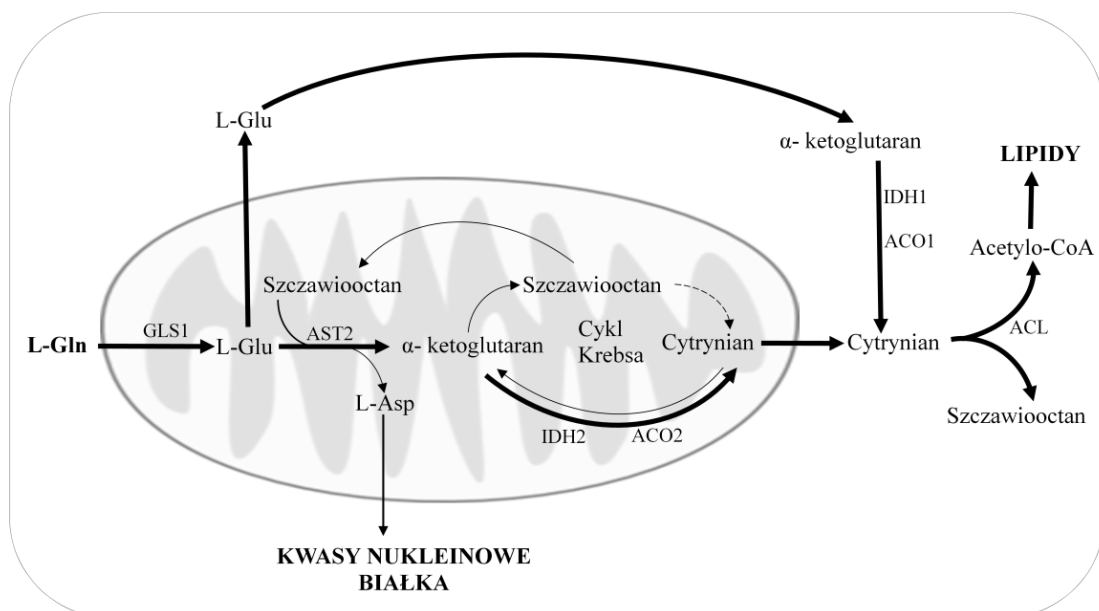
C-myc aktywuje glutaminolizę wpływając na wzrost ekspresji genów transporterów glutaminy (ASCT2 i SN2) oraz genu glutaminazy (GLS1) [68]. Umożliwia więc zapoczątkowanie szlaku przez wprowadzenie glutaminy do mitochondriów oraz jej deamidację do glutaminianu. C-myc zwiększa także liczbę mitochondriów (biogeneza), w których jest umiejscowiona większość enzymów glutaminolizy [39, 47] (ryc. 4).

Można więc stwierdzić, że tlen nasila efekt Warburga w normoksji będąc pośrednim aktywatorem enzymów cyklu Krebsa wchodzących w skład szlaku glutaminolizy. Mleczan jest końcowym produktem tego szlaku dostarczającego komórkom energii z utleniania  $NADH$  i  $FADH_2$

powstających w cyklu Krebsa oraz zredukowanego NADP (NADPH) wykorzystywanego do syntezy lipidów, kwasów nukleinowych oraz w reakcjach obniżających wewnątrzkomórkowy poziom RFT. Powstawanie mleczanu w glutaminolizie powoduje jednocześnie zwiększenie syntezy mleczanu z glukozy, gdyż MDH1 i LDHA (oś szczawiooctan-jabłczan-pirogronian-mleczan) odtwarzają  $NAD^+$  niezbędny do wydajnego przebiegu glikolizy.

#### HIF-1 HAMUJE SYNTEZĘ MLECZANU Z GLUTAMINY W HIPOKSJI

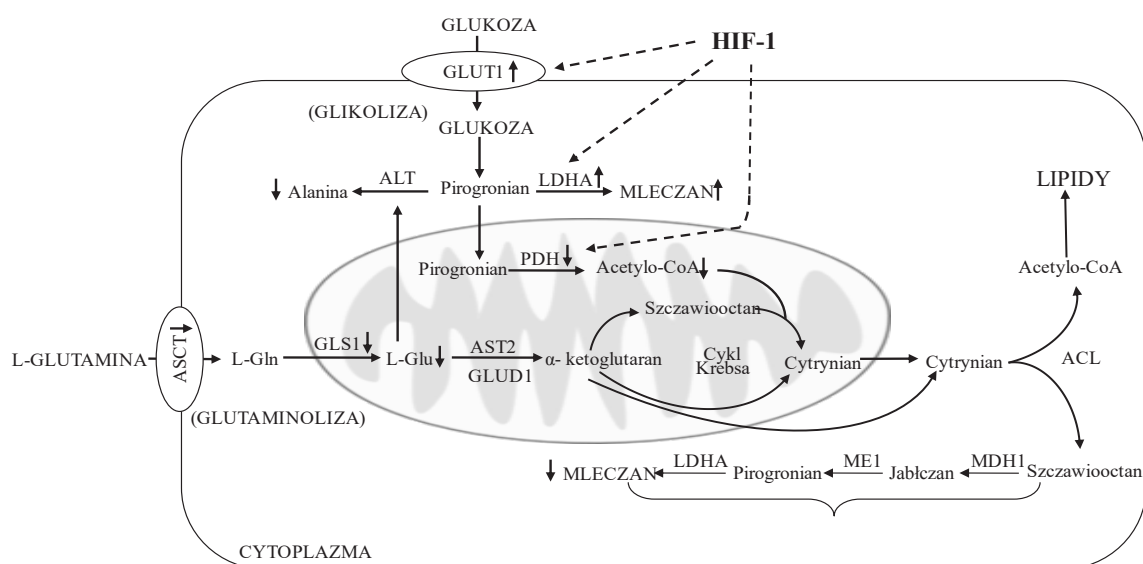
W ostatnich latach w komórkach szybko dzielących się, w tym nowotworowych, w oparciu o wyniki badań znanych metabolitów stwierdzono, że w hipoksji zachodzą dwa alternatywne („niekanoniczne”) szlaki glutaminolizy umiejscowione w cytoplazmie i mitochondrium [49, 69]. Ich istotą jest redukcjna karboksylacja  $\alpha$ -ketoglutaranu do izocytrynianu, przekształcanego następnie do cytrynianu. Kierunek obu reakcji jest odwrotny niż w cyklu Krebsa („pod prąd”): w mitochondrium zachodzą z udziałem mitochondrialnych izoform dehydrogenazy izocytrynianowej (IDH2) i cis-akonitazy (ACO2), a w cytoplazmie z udziałem cytoplazmatycznych izoform tych enzymów (kolejno IDH1 i ACO1) (ryc. 5) [24, 45]. Aktywność alternatywnych glutaminoliz umożliwia syntezę cytrynianu bez udziału dehydrogenaz cyklu Krebsa, a zatem i łańcucha oddechowego - źródła znacznych ilości RFT w hipoksji. Jest to zarazem mechanizm kompensujący zmniejszone wytworzenie cytrynianu z acetylo-CoA pochodzącego z glikolizy (skutek wspomnianego wyżej hamowania aktywności PDH przez HIF-1). Należy zaznaczyć, że alternatywne szlaki glutaminolizy nie zastępują całkowicie drogi klasycznej, gdyż w hipoksji fosforylacja oksydacyjna jest nadal wydajna, choć nie w takim stopniu jak w normoksji [23].



Ryc. 5. Szlaki glutaminolizy alternatywnej w hipoksji (wg [3] zmodyfikowano)

Synteza mleczanu w glutaminolizie w hipoksji jest ograniczona z powodu mniejszej podaży L-Gln w hipoksyjnym środowisku guza nowotworowego, jak również z obniżania aktywności c-myc przez HIF-1, a to zahamowuje glutaminolizę, a także zmniejsza liczbę mitochondriów [19, 29, 71]. Znaczne zmniejszenie poziomu białka c-myc oraz mniejszą ekspresję mRNA C-MYC w hipoksji wykazano w wielu liniach komórek nowotworowych (np. raka sutka, płuca, szyjki macicy, jelita grubego

człowieka) [18, 19]. Powyższy mechanizm dostosowuje metabolizm komórek nowotworowych do zmniejszonej dostępności tlenu, substancji odżywczych i budulcowych oraz chroni przed stresem oksydacyjnym wynikającym ze zwiększonego wytwarzania RFT w łańcuchu oddechowym. W hipoksji metabolizm komórki zostaje przestawiony na tryb oczekiwania (stand-by), a więc na przywrócenie warunków tlenowych, a głównym szlakiem umożliwiającym przetrwanie staje się gliko-



Ryc. 6. Wpływ czynnika transkrypcyjnego HIF-1 na syntezę mleczanu z glukozy i glutaminy w hipoksji

liza. Ponadto, zmniejszona ekspresja i aktywność GLS1 powodują dodatkowy wzrost syntezy mleczanu z glukozy, gdyż wskutek zmniejszenia podaży L-Glu z glutaminolizy zmniejsza się zużycie pirogronianu do syntezy L-alaniny (ryc. 6) [21].

## PODSUMOWANIE

Powszechnie wiadomo, że mleczan jest syntetyzowany z glukozy w komórkach, w których występuje niedo-

bór tlenu (intensywnie pracujące mięśnie) lub nie mają mitochondriów (erytrocyty). W komórkach nowotworowych mleczan powstaje również w normoksji, co Otto Warburg wiązał z uszkodzeniem mitochondriów. Obecnie wiadomo, że w komórkach tych mleczan jest syntetyzowany nie tylko z glukozy (glikoliza tlenowa), ale również z glutaminy, w szlaku glutaminolizy, który przebiega w pełni sprawnych mitochondriach i jest aktywowany przez tlen. Tak więc, efekt Warburga jest wynikiem pobudzanego przez tlen intensywnego wytwarzania mleczanu w szlakach glikolizy i glutaminolizy.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Adhikary S., Eilers M.: Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2005; 6: 635-645
- [2] Altman B.J., Stine Z.E., Dang C.V.: From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2016; 16: 619-634
- [3] Anastasiou D., Cantley L.C.: Breathless cancer cells get fat on glutamine. *Cell Res.*, 2012; 22: 443-446
- [4] Ben-Porath I., Thomson M.W., Carey V.J., Ge R., Bell G.W., Regev A., Weinberg R.A.: An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat. Genet.*, 2008; 40: 499-507
- [5] Boros L.G., Torday J.S., Lim S., Bassilian S., Cascante M., Lee W.N.: Transforming growth factor  $\beta$ 2 promotes glucose carbon incorporation into nucleic acid ribose through the nonoxidative pentose cycle in lung epithelial carcinoma cells. *Cancer Res.*, 2000; 60: 1183-1185
- [6] Brizel D.M., Sibley G.S., Prosnitz L.R., Scher R.L., Dewhirst M.W.: Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1997; 38: 285-289
- [7] Brown J.M.: The hypoxic cell: A target for selective cancer therapy – eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award lecture. *Cancer Res.*, 1999; 59: 5863-5870
- [8] Burgman P., O'Donoghue J.A., Humm J.L., Ling C.C.: Hypoxia-induced increase in FDG uptake in MCF-7 cells. *J. Nucl. Med.*, 2001; 42: 170-175
- [9] Burke P.V., Poyton R.O.: Structure/function of oxygen-regulated isoforms in cytochrome c oxidase. *J. Exp. Biol.*, 1998; 201: 1163-1175
- [10] Busk M., Horsman M.R., Kristjansen P.E., van der Kogel A.J., Busink J., Overgaard J.: Aerobic glycolysis in cancers: implications for the usability of oxygen-responsive genes and fluorodeoxyglucose-PET as markers of tissue hypoxia. *Int. J. Cancer*, 2008; 122: 2726-2734
- [11] Carmeliet P., Dor Y., Herbert J.M., Brusselmans K., Dewerchin M., Neeman M., Bono F., Abramovitch R., Maxwell P., Koch C.J., Ratcliffe P., Moons L., Jain R.K., Collen D., Keshert E.: Role of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*, 1998; 394: 485-490
- [12] Cascante M., Centelles J.J., Veech R.L., Lee W.N., Boros L.G.: Role of thiamin (vitamin B-1) and transketolase in tumor cell proliferation. *Nutr. Cancer*, 2000; 36: 150-154
- [13] Chandel N.S., Maltepe E., Goldwasser E., Mathieu C.E., Simon M.C., Schumacker P.T.: Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 11715-11720
- [14] Chandel N.S., McClintock D.S., Feliciano C.E., Wood T.M., Melendez J.A., Rodriguez AM, Schumacker P.T.: Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  during hypoxia: a mechanism of O<sub>2</sub> sensing. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 25130-25138
- [15] Chen C., Pore N., Behrooz A., Ismail-Beigi F., Maity A.: Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 9519-9525
- [16] Chen M.K., Espat N.J., Bland K.I., Copeland E.M III., Souba W.W.: Influence of progressive tumor growth on glutamine metabolism in skeletal muscle and kidney. *Ann Surg.*, 1993; 217: 655-666
- [17] Clavo A. C., Brown R.S., Wahl R.L.: Fluorodeoxyglucose uptake in human cancer cell lines is increased by hypoxia. *J. Nucl. Med.*, 1995; 36: 1625-1632
- [18] Corn P.G., Ricci M.S., Scata K.A., Arsham A.M., Simon M.C., Dicker D.T., El-Deiry W.S.: Mx1 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
- [19] Dang C.V., Kim J.W., Gao P., Yustein J.: The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2008; 8: 51-56
- [20] Dang C.V., Le A., Gao P.: MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. *Clin. Cancer Res.*, 2009; 15: 6479-6483
- [21] DeBerardinis R.J., Mancuso A., Daikhin E., Nissim I., Yudkoff M., Wehrli S., Thompson C.B.: Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 19345-19350
- [22] DeClerck K., Elble R.C.: The role of hypoxia and acidosis in promoting metastasis and resistance to chemotherapy. *Front. Biosci.*, 2010; 15: 213-225
- [23] Fan J., Kamphorst J.J., Mathew R., Chung M. K., White E., Shlomi T., Rabinowitz J. D.: Glutamine-driven oxidative phosphorylation is a major ATP source in transformed mammalian cells in both normoxia and hypoxia. *Mol. Syst. Biol.*, 2013; 9: 712
- [24] Filipp F.V., Scott D.A., Ronai Z.A., Osterman A.L., Smith J.W.: Reverse TCA cycle flux through isocitrate dehydrogenases 1 and 2 is required for lipogenesis in hypoxic melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.*, 2012; 25: 375-383
- [25] Folkman J.: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.*, 1971; 285: 1182-1186
- [26] Forsythe J.A., Jiang B.H., Iyer N.V., Agani F., Leung S.W., Koos R.D., Semenza G.L.: Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.*, 1996; 16: 4604-4613
- [27] Fukuda R., Zhang H., Kim J.W., Shimoda L., Dang C.V., Semenza G.L.: HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell*, 2007; 129: 111-122
- [28] Gambhir S.S.: Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat. Rev. Cancer*, 2002; 2: 683-693
- [29] Gordan J.D., Thompson C.B., Simon M.C.: HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell*, 2007; 12: 108-113
- [30] Graboń W., Otto-Ślusarczyk D., Chrzanowska A., Mielczarek-Puta M., Joniec-Maciejak I., Ślabik K., Barańczyk-Kuźma A.: Lactate formation in primary and metastatic colon cancer cells at hypoxia and normoxia. *Cell Biochem. Funct.*, 2016; 34: 483-490



- [31] Groussard C., Morel I., Chevanne M., Monnier M., Cillard J., Delamarche A.: Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study. *J. Appl. Physiol.*, 2000; 89: 169-175
- [32] Hockel M., Schlenger K., Aral B., Mitze M., Schaffer U., Vaupel P.: Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res.*, 1996; 56: 4509-4515
- [33] Jiang B.H., Semenza G.L., Bauer C., Marti H.H.: Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension. *Am J. Physiol.*, 1996; 271: c1172-c1180
- [34] Kim J.W., Tchernyshyov I., Semenza G.L., Dang C.V.: HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.*, 2006; 3: 177-185
- [35] Klimberg V.S., McClellan J.L.: Claude H. Organ, Jr. Honorary Lectureship. Glutamine, cancer, and its therapy. *Am J. Surg.*, 1996; 172: 418-424
- [36] Kovacevic Z., Brkljac O., Bajin K.: Control and function of the transamination pathways of glutamine oxidation in tumour cells. *Biochem J.*, 1991; 273: 271-275
- [37] Langbein S., Zerilli M., Zur Hausen A., Staiger W., Rensch-Boschert K., Lukan N., Popa J., Ternullo M.P., Steidler A., Weiss C., Grobholz R., Willeke F., Alken P., Stassi G., Schubert P., Coy J.F.: Expression of transketolase TKTL1 predicts colon and urothelial cancer patient survival: Warburg effect reinterpreted. *Br. J. Cancer*, 2006; 94: 578-585
- [38] Lee P.J., Jiang B.H., Chin B.Y., Iyer N.V., Alam J., Semenza G.L., Choi A.M.: Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 5375-5381
- [39] Li F., Wang Y., Zeller K.I., Potter J.J., Wonsey D.R., O'Donnell, K.A., Kim J.W., Yustein J.T., Lee L.A., Dang C.V.: Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Mol. Cell. Biol.*, 2005; 25: 6225-6234
- [40] Liao D., Johnson R.S.: Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, 2007; 26: 281-290
- [41] Liu Y.C., Li F., Handler J., Huang C.R., Xiang Y., Neretti N., Sedivy J.M., Zeller K.I., Dang C.V.: Global regulation of nucleotide biosynthetic genes by c-Myc. *PLoS One*, 2008, 3: e2722
- [42] Lobo C., Ruiz-Bellido M.A., Aledo J.C., Márquez J., Núñez de Castro I., Alonso F.J.: Inhibition of glutaminase expression by antisense mRNA decreases growth and tumorigenicity of tumour cells. *Biochem. J.*, 2000; 348: 257-261
- [43] Marx E., Mueller-Klieser W., Vaupel P.: Lactate-induced inhibition of tumor cell proliferation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1988; 14: 947-955
- [44] Mathupala S.P., Rempel A., Pedersen P.L.: 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: 43407-43412
- [45] Metallo C.M., Gameiro P.A., Bell E.L., Mattaini K.R., Yang J., Hiller K., Jewell C.M., Johnson Z.R., Irvine D.J., Guarente L., Kelleher J.K., Vander Heiden M.G., Iliopoulos O., Stephanopoulos G.: Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature*, 2011; 481: 380-384
- [46] Moreadith R.W., Lehninger A.L.: The pathways of glutamate and glutamine oxidation by tumor cell mitochondria. Role of mitochondrial NAD(P)<sup>+</sup>-dependent malic enzyme. *J. Biol. Chem.*, 1984; 259: 6215-6221
- [47] Morrish F., Hockenberry D.: MYC and mitochondrial biogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect Med.*, 2014; 4: a014225
- [48] Mullen A.R., Wheaton W.W., Jin E.S., Chen P.H., Sullivan L.B., Chen T., Yang Y., Linehan W.M., Chandel N.S., DeBerardinis R.J.: Reductive carboxylation supports growth in tumor cells with defective mitochondria. *Nature*, 2011; 481: 385-388
- [49] Nikiforov M.A., Chandriani S., O'Connell B., Petrenko O., Kottenko I., Beavis A., Sedivy J.M., Cole M.D.: A functional screen for Myc responsive genes reveals serine hydroxymethyltransferase, a major source of the one-carbon unit for cell metabolism. *Mol. Cell. Biol.*, 2002; 22: 5793-5800
- [50] Nordmark M., Overgaard M., Overgaard J.: Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother. Oncol.*, 1996; 41: 31-39
- [51] O'Connell B.C., Cheung A.F., Simkevich C.P., Tam W., Ren X., Matyak M.K., Sedivy J.M.: A large scale genetic analysis of c-Myc-regulated gene expression patterns. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 12563-12573
- [52] Osthus R.C., Shim H., Kim S., Li Q., Reddy R., Mukherjee M., Xu Y., Wonsey D., Lee L.A., Dang C.V.: Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 21797-21800
- [53] Palmer L.A., Semenza G.L., Stoler M.H., Johns R.A.: Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am. J. Physiol.*, 1998; 274: L212-L219
- [54] Pérez-Gómez C., Campos-Sandoval J.A., Alonso F.J., Segura J.A., Manzanares E., Ruiz-Sánchez P., González M.E., Márquez J., Matés J.M.: Co-expression of glutaminase K and L isoenzymes in human tumour cells. *Biochem. J.*, 2005; 386: 535-542
- [55] Sabharwal S.S., Schumacker P.T.: Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat. Rev. Cancer*, 2014; 14: 709-721
- [56] Salceda S., Caro J.: Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 22642-22647
- [57] Semenza G.L., Jiang B.H., Leung S.W., Passantino R., Concorde J.P., Maire P., Giallongo A.: Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 32529-32537
- [58] Shim H., Dolde C., Lewis B.C., Wu C.S., Dang G., Jungmann R.A., Dalla-Favera R., Dang C.V.: c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 6658-6663
- [59] Son J., Lyssiotis C.A., Ying H., Wang X., Hua S., Ligorio M., Perera R.M., Ferrone C.R., Mullarky E., Shyh-Chang N., Kang Y., Fleming J.B., Bardeesy N., Asara J.M., Haigis M.C. i wsp.: Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature*, 2013; 496: 101-105
- [60] Sullivan L.B., Chandel N.S.: Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer Metab.*, 2014; 2: 17
- [61] Trent J., Meltzer P., Rosenblum M., Harsh G., Kinzler K., Mashal R., Feinberg A., Vogelstein B.: Evidence for rearrangement, amplification, and expression of c-myc in a human glioblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986; 83: 470-473
- [62] Turner A., McGivan J.D.: Glutaminase isoform expression in cell lines derived from human colorectal adenomas and carcinomas. *Biochem. J.*, 2003; 370: 403-408
- [63] Ullah M.S., Davies A.J., Halestrap A.P.: The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 $\alpha$ -dependent mechanism. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 9030-9037
- [64] Vaupel P.: Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin. Radiat. Oncol.*, 2004; 14: 198-206
- [65] Vaupel P., Kallinowski F., Okunieff P.: Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res.*, 1989; 49: 6449-6465

[66] Vaupel P., Thews O., Hoeckel M.: Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med. Oncol.*, 2001; 18: 243-259

[67] Warburg O.: On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 1956; 124: 269-270

[68] Wise D.R., DeBerardinis R.J., Mancuso A., Sayed N., Zhang X.Y., Pfeiffer H.K., Nissim I., Daikhin E., Yudkoff M., McMahon S.B., Thompson C.B.: Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 18782-18787

[69] Wise D.R., Ward P.S., Shay J.E., Cross J.R., Gruber J.J., Sachdeva U.M., Platt J.M., DeMatteo R.G., Simon M.C., Thompson C.B.: Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of  $\alpha$ -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 19611-19616

[70] Yang L., Venneti S., Negrath D.: Glutaminolysis: a hallmark of cancer metabolism. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2017; 19: 163-194

[71] Zhang H., Gao P., Fukuda R., Kumar G., Krishnamachary B., Zeller K.I., Dang C.V., Semenza G.L.: HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell*, 2007; 11: 407-420

---

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.