Glikolitički biomarkeri stanica raka

Jurković, Vedrana

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:963601

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Vedrana Jurković

GLIKOLITIČKI BIOMARKERI U STANICAMA RAKA

(Glycolytic biomarkers in cancer cells)

Završni rad

Mentor:

Prof.dr.sc. Elizabeta Has-Schön

Neposredni voditelj:

Dr.sc. Martina Šrajer Gajdošik

Osijek.2015.

SADRŽAJ

1. Uvod 6
2. Literaturni pregled 7
2.1. Što je rak? 7
2.1.1. Apoptoza stanica raka 8
2.2. Definicija biomarkera 10
2.2.1. Svojstva biomarkera 10
2.3. Metabolički putovi u stanicama raka 11
2.3.1. Glikoliza 12
2.3.2. Heksokinaza 14
2.3.3. Fosfofruktokinaza 15
2.3.4. Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza 16
2.3.5. Fosfoglicerat mutaza 17
2.3.6. Piruvat kinaza 17
2.4. Mitohondrij i njegova središnja uloga u apoptozi 18
2.5. Warburg-ov efekt 19
2.6. Metode analize metaboličkih putova u stanicama raka 20
2.6.1. NMR spektroskopija 21
2.6.2. Plinska kromatografija, tekuća kromatografija, masena spektrometrija 21
3. Zaključak 22
4. Literatura 23

POPIS KRATICA

Kratica	Značenje
ATP	adenozin trifosfat
LD	laktat dehidrogenaza
HK	heksokinaza
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
PKM-2	M2 oblik piruvat kinaze
PEP	fosfoenolpiruvat
ADP	adenozin difosfat
NADH	reducirani oblik nikotinamid adenin dinukleotida
PK	piruvat kinaza
cAMP	ciklički adenozin monofosfat
HIF-1	hipoksijski inducibilni faktor-1
PDK-1	piruvat dehidrogenaza kinaza-1
HK	heksokinaza
G-6-P	glukoza-6-fosfat
BrPyr	inhibitor heksokinaze
PFK	fosfofruktokinaza
CaM	kalmodulin
PGM	fosfoglicerat mutaza
3-PG	3-fosfoglicerat
NADPH	reducirani nikotinamid dinukleotid fosfat
PIR	piruvat
PK	piruvat kinaza
Bcl-xL	transmembranski protein

Sažetak

Još su rana otkrića pokazala da su ubrzana potrošnja glukoze i izlučivanje laktata u ljudskom tijelu povezana sa mnogim vrstama raka. Rak je karakteriziran stalnim rastom i širenjem na druge organe koje uništava (jednako kao što uništi i organ u kojemu je nastao). Nadalje, mnogi vanjski čimbenici utječu na lokaciju nastanka malignih stanica; nikotin, razni insekticidi, mikroorganizmi, pogrešna i prekomjerna prehrana samo su neki od njih. Na različitim pokusnim modelima dokazano je da je apoptoza temeljni proces u održavanju mase i funkcionalne sposobnosti pojedinih organa. Možemo razlikovati vanjski put apoptoze koji uključuje receptore smrti i unutarnji put koji se još naziva mitohondrijski.

Opažanje O. Warburga temelji se na stanicama raka koje imaju pojačanu glikolitičku aktivnost i povišenu razinu mliječne kiseline čak i pri aerobnim uvjetima u stanici. Značajno je da dva glikolitička enzima, heksokinaza (HK) i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GADPH), imaju ključnu ulogu u održavanju ravnoteže između preživljavanja stanice i stanične smrti.. dok M2 oblik piruvat kinaze sudjeluje u anaboličkom metabolizmu i pojačano je eksprimiran u malignim stanicama i zdravom tkivu. Klinička ispitivanja koja su u tijeku mogla bi, također, otkriti puni potencijal inhibicije drugih glikolitičkih enzima poput fosfofruktokinaze (PFK) i piruvat kinaze (PK) u razvoju novih antikancerogenih terapija.

Ključne riječi: rak, glikolitički enzimi apoptoza, biomarker, Warburg-ov efekt

Abstract

Early discoveries showed that rapid consumption of glucose and secretion of lactate are associated with many types of cancer. Cancer is characterized by constant growth and expansion to other organs which it destroys (as well as it destroys its originating organ). Furthermore, many factors affect the localization of malignant cells; nicotine, various insecticides, microorganisms, also erroneous and over-nutrition are only some of them. Different experimental models showed that apoptosis is a fundamental process in maintaining the mass and functional abilities of certain organs. We can distinguish the outer pathway of apoptosis that involves death receptors and the inner pathway that is also called mitochondrial.

Observation of O.Warburg is based on the cancer cells that have increased glycolytic activity and elevated levels of lactic acid even under aerobic conditions of the cell. Significantly two glycolytic enzymes, hexokinase (HK) and Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GADPH) act as crucial players in modulating the balance between cell survival and cell death, while M2 isoform of pyruvate kinase (PKM-2) supports anabolic metabolism and is expressed both in malignant cells and healthy tissue. Ongoing clinical trials will help assess the full potential of the inhibition of other glycolitic enzimes, like phosphofructokinase (PFK) and pyruvate kinase (PK), for the development of novel anticancer therapies.

Key words: cancer, glycolytic enzymes, apoptosis, biomarker, Warburg effect

1. Uvod

Rak je naziv za skupinu srodnih bolesti u kojima se ljudske stanice počinju dijeliti bez zaustavljanja i širiti u okolna tkiva, dok rast može započeti bilo gdje u tijelu. Kako se on razvija, stanice postaju abnormalnije, stare i oštećene stanice ne umiru a nove stanice rastu iako nema potrebe za tim. Naglo pojavljivanje raka smatra se posljedicom industrijalizacije i sve veće upotrebe kemijskih sredstava. Nakon niza godina intenzivnih istraživanja ova je bolest i dalje velika zagonetka od koje svake godine milijuni osoba prerano umiru. No na svu sreću naša tijela su također opremljena i mehanizmima koji otkrivaju defektne stanice i drže ih pod određenom kontrolom i nadzorom. U ovom radu opisat ću rak, njegove simptome i statističke podatke. Objasnit ću što se dogodi prije nastanka prve maligne stanice u tijelu, odnosno što bi se trebalo događati u zdravom tkivu, a ipak krene po zlu. Apoptoza ili programirana stanična smrt, normalna je komponenta razvoja i zdravlja višestaničnih organizama. Stanice umiru kao odgovor na različite podražaje i tijekom apoptoze to čine u kontroliranim uvjetima. To čini apoptozu različitom od drugih oblika stanične smrti kao npr. nekroze; odumiranja stanica u živim tkivima uzrokovanim neprirodnim uzrocima. Istraživači su izvijestili da su pronašli način da profiliraju rak ovisno o tome kako su blizu stanice raka smrti, a to bi moglo pomoći u određivanju onih koje bi mogle biti najviše osjetljive na kemoterapiju [1]. Zatim ću objasniti definiciju biomarkera, i njihova svojstva. Oni mogu biti korisni na više načina, određujući progresiju bolesti i procjenjujući najučinkovitiju terapiju za određenu vrstu raka. Biomarkeri pomažu pri ranoj dijagnozi, prevenciji raka, određivanju izvora malignih stanica i učinkovitosti terapije. Parametri mogu biti biološki, kemijski ili fizikalni. Naglasak ovog rada je na glikolitičkim biomarkerima, odnosno enzimima metaboličkog procesa glikolize, a za koje je otkriveno da mogu bitiodgovorni za rast i razvoj raka, ali i za otkrivanje terapeutskih oružja u borbi protiv te bolesti. Prvo će biti riječi o procesu glikolize, početnoj fazi razgradnje glukoze i središnjem mjestu u metabolizmu mnogih organizama. Nadalje, kako bi shvatili Warburg-ov efekt, prvo treba opisati glikolitičke enzime; heksokinazu (HK), fosfofruktokinazu (PFK), gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH), fosfoglicerat mutazu (PGM) i piruvat kinazu (PK). HK, PFK, i PK su regulatorni enzimi u glikolizi i aktivacijom ili inhibicijom svojih supstrata utječu na tok metabolizma u tijelu. Na kraju ću kratko pojasniti metode analize metabolizma i ulogu mitohondrija u apoptozi gdje je specijaliziran za registraciju različitih signala, poput koncentracije metabolita pomoću signalnih molekula kinaza i fosfataza koje ne djeluju istovremeno.

2. Literaturni pregled

2.1. Što je rak?

Rak ili zloćudna (maligna) novotvorina (neoplazma, tumor) je novotvorina kojoj je svojstvena nekontrolirana dioba stanica, odnosno sposobnost stanica da prodru u ostatak tkiva, bilo izravnim urastanjem (invazija) bilo migracijom do udaljenih područja tijela (metastaze). U zdravom tijelu stanice rastu, umiru ili bivaju zamijenjene u vrlo kontroliranim uvjetima. Šteta ili neka promjena na genetskom materijalu stanice uzrokovana okolišem ili pak unutarnjim faktorima ne rezultira umiranjem stanica već se one nastave umnažati i rasti dok se ne razvije tumor [1]. Učestalost malignih tumora u današnje vrijeme stalno raste. Rak je bolest od koje umire oko 13% ljudi, oko trećine svih tumora može se spriječiti, a naredna trećina se može izliječiti današnjim načinima liječenja. Većina smrti uzrokovana malignim tumorom (rakom) nastupi zbog metastaza; malignih stanica koje penetriraju u krvožilni sustav i stvaraju nove nakupine takvih stanica u drugim dijelovima tijela. Pažljivim proučavanjem uočeno je da se maligne stanice od normalnih razlikuju u šest temeljnih karakteristika i to su: otpornost stanica raka na samouništenje (apoptozu), neograničeno umnožavanje stanica (proliferacija), nemogućnost zaustavljanja tog umnažanja, samodostatnost u stvaranju signala rasta, stvaranje novih krvnih žila koje raku omogućuju prehranu, te širenje na druge organe ili metastaziranje [2].

Rak može nastati u bilo kojem dijelu tijela, uglavnom na plućima, debelom crijevu, grliću maternice, prostati, koži, jetri, bubrezima, u krvi i dr. Najčešći rak kod žena je rak dojke, dok je kod muškaraca rak prostate, a rak pluća i rak debelog crijeva podjednako pogađa i mušku i žensku populaciju. Postoje razni čimbenici koji se smatraju uzročnicima raka; azbest, nikotin, razni insekticidi, prekomjerna i pogrešna prehrana samo su jedni od njih. Radioaktivne kemikalije, UV i rendgensko zračenje, mikroorganizmi kao što su HPV virusi, virus hepatitisa B, paraziti i bakterije su samo neki fizikalni agensi koji djeluju na naš biološki sustav i izazivaju mutacije u zdravim stanicama. Neke su osobe genetski sklone tumorima, a kod nekih navedeni agensi izmijene genetski materijal što omogućava nastanak tumora ili raka. Kada je on dijagnosticiran, sljedeće pitanje je koliko je rast tih stanica napredovao, odnosno u kojem stupnju se nalazi tumor. Određuje se gdje se nalazi tumor, koliko se proširio na druge organe, i sl. Samo liječenje tumora je jako kompleksno, budući da je svaki tumor individualan, odnosno različit kod svake osobe. Razlog tome je što se ne radi o identičnim

malignim stanicama, tumori nisu homogeni već postoje različite vrste tj. podtipovi stanica u istom tumoru, stoga se primjenjuju različite vrste i načini lječenja.

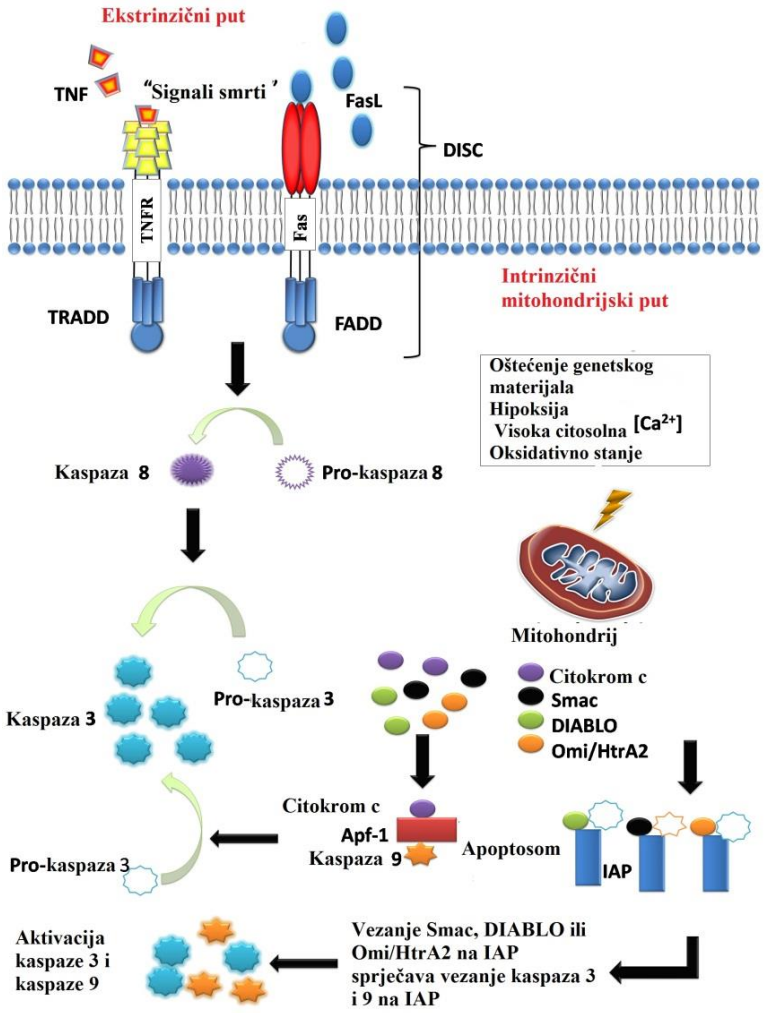
Neki tumori rastu vrlo brzo, a neki sporo, i nisu svi tumori kancerogeni. Oni se nazivaju benigni tumori. Takva vrsta tumora se ne širi na zdrava tkiva i organe i ostaje u jednom području, dakle ne metastazira. Maligni tumori su kancerogeni te se širi kroz limfne i krvne sisteme na druge dijelove tijela od tzv. primarnog žarišta [17]. Postoji veliki broj vrsta raka. Rak pluća, debelog crijeva, dojke i jajnika su najučestaliji. Sarkom se nalazi u kosti, hrskavici, masnim naslagama i mišiću. Limfom nastaje u limfnim čvorovima tjelesnog imunosistema te on obuhvaća Hodgkinove i ne-Hodgkinove limfome a leukemija nastaje u krvnim stanicama koje rastu u koštanoj srži i nalaze se u velikom broju u krvotoku [16,17].

Simptomi raka zavise od njegove vrste i lokacije. Kod nekih oboljenja od raka mogu izostati bilo kakvi znaci sve dok se tumor ne poveća. Uobičajeni simptomi uključuju: osjećaj velikog umora, gubitak težine koji se pojavljuje bez znanja uzroka, groznica, zimica ili noćno znojenje, nedostatak apetita, dijareja, konstipacija ili krv u stolici, fizička neugodnost ili bol, kašalj, nedostatak daha ili bol u prsima, Kada se rak otkrije, pretragama se utvrđuje je li se rak proširio na ostale dijelove tijela. Mogu biti potrebna ispitivanja, rendgen i nalazi krvi. Bolest može dugo prolaziti podmuklo, bez simptoma. Tek u odmakloj fazi daje jasne simptome. Do tada simptomi su slični nekim drugim, manje opasnim bolestima. Nadalje, istraživači smatraju da kemoterapija često u najboljem slučaju samo ubrzava proces stanične smrti, a svaka zdrava stanica je programirana da to radi. Studija na taj način podiže neka važna pitanja o korištenju kemoterapije; npr. bi li stanice raka koje reagiraju na kemoterapije ionako umrle prirodno ? I, ako kemoterapija uglavnom samo ubrzava prirodni proces, da li je to vrijedno oštećenja zdravih stanica i organa i prolaska kroz oslabljujuće učinke kemoterapije ? Istraživanja su pokazala da u najboljem slučaju kemoterapija rezultira u samo 2-3% povećanju vremena preživljavanja.

2.1.1. Apoptoza stanica raka

Najčešći oblik smrti kao odgovor na fiziološke podražaje i patološka oštećenja stanica uzrokovana različitim unutrašnjim ili vanjskim čimbenicima zbog čega postaju opasne i/ili nekorisne za organizam je **apoptoza**. Na različitim pokusnim modelima dokazano je da je apoptoza temeljni proces u održavanju mase i funkcionalne sposobnosti pojedinih organa.

Apoptoza je u većini tkiva prisutna kao dio fiziološkog razvoja organizma počevši od programiranog uništavanja stanica tijekom embriogeneze. [4]. Za njezin nastanak potrebna je energija i aktivacija specifičnih gena i enzima. Najviše stanica osjetljivih na apoptozu *in vitro* upravo su stanice raka. Sada se postavlja pitanje zašto su te stanice toliko osjetljive na apoptozu, a ipak ne umiru. Rak je jedan od scenarija gdje je stanična smrt vrlo malo ili nikako aktivirana. Apoptoza je regulirana proteolitičkim enzimom, kaspazom, koja započinje staničnu smrt cijepanjem specifičnih proteina u citoplazmi i jezgri. Ona postoji u svim stanicama kao inaktivni prekursor (prokaspaza). Mehanizam je vrlo kompleksan i sastoji se od većeg broja reakcija (Slika 1). Unatoč tome što je uzrok problema, apoptoza može biti i odgovor na liječenje raka, no to područje se još istražuje.



Slika 1. Intrinzični i ekstrinzični putovi apoptoze
Izvor: Preuzeto i prilagođeno iz [4].

2.2. Definicija biomarkera

Biomarkeri su indikatori koji signaliziraju događaj ili stanje u biološkom sustavu ili uzorku i prikazuju razinu izloženosti, učinke ili osjetljivost. To su mjerljive promjene parametara bioloških sustava koji se prate pomoću biomonitoringa. Postoji mnogo vrsta biomarkera koji se mogu vrlo lako izmjeriti i utvrditi poput krvnog tlaka, koji je indikator za povećan rizik od srčanog udara, do kompleksnijih genetskih promjena ili mutacija na genu u tumorskim stanicama koje nam mogu pomoći identificirati pojedinu vrstu tumora. Biomarkeri nam daju informacije o riziku razvijanja tumora kod pacijenta, također pomoću njih možemo postaviti prognoze razvijanja bolesti onda kad je dijagnoza postavljena, i u nekim slučajevima predvidjeti kako će osoba reagirati na određeni lijek. Dio su bioloških procesa koji se odvijaju u našem tijelu pri normalnim uvjetima, uslijed neke bolesti ili kao odgovor na određene lijekove ili tretmane koje prolazi pacijent. Biomarkeri ili biološki markeri obuhvaćaju indikacije medicinskog stanja pacijenta promatranog izvana – koje se mogu precizno izmjeriti.

2.2.1. Svojstva biomarkera

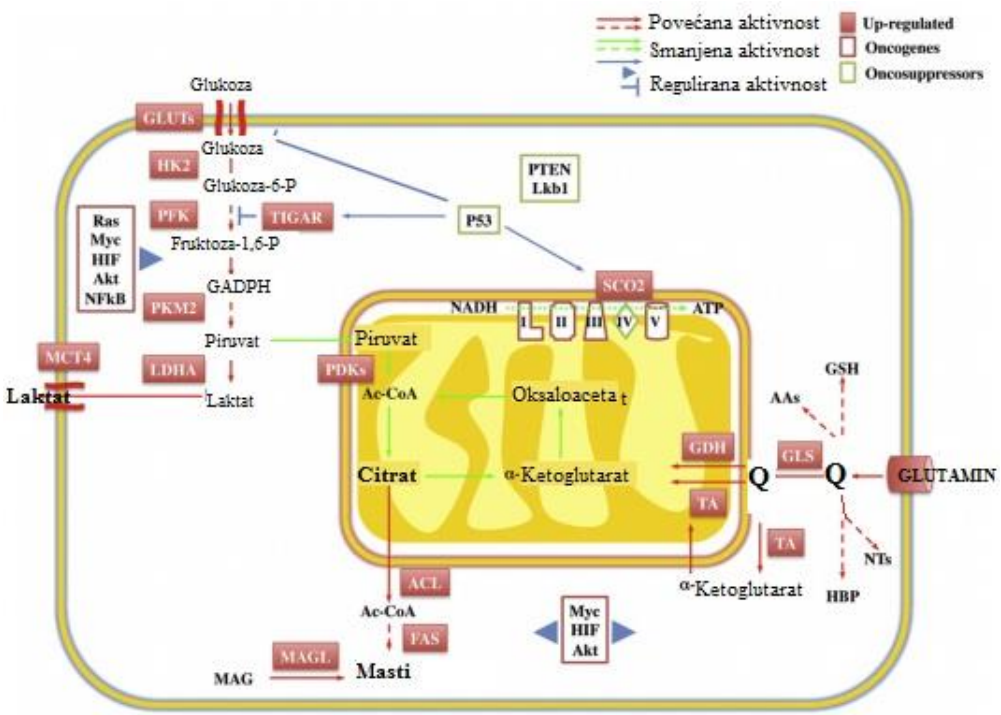
Validacijski kriteriji za biomarker se definiraju prema svrsi za koju je pojedini biomarker namijenjen te se treba standardizirati u različitim populacijama sa slijedećim ciljevima:
1) Klinička važnost: biomarker ima sposobnost da prati promjene patološkog procesa i/ili terapeutske intervencije u relativno kratkom vremenskom periodu.
2) Osjetljivost: mogućnost da se biomarker izmjeri sa zadovoljavajućom preciznošću i da promjena biomarkera odražava promjenu određenog kliničkog cilja.
3) Specifičnost: sposobnost biomarkera da identificira osobe koje boluju od određene bolesti ili odgovor na određenu inetrevenciju
4) Vjerojatnost lažno pozitivnih i lažno negativnih slučajeva: koja se definira situacijom u kojoj promjena biomarkera ne odražava promjenu određenog kliničkog cilja.
5) Točnost, preciznost, reproducibilnost i varijabilnost laboratorijskog testa kojim se biomarker mjeri [5].

Oni su od neprocjenjive koristi u otkrivanju, određivanju stupnja ili klasifikaciji proširenosti, prognozi bolesti te procjeni i praćenju kliničkog odgovora na liječenje. Opće je poznato da rak

nastaje zbog perturbacija odnosno narušavanja ustaljenog reda u metabolizmu čovjeka, ali mehanizmi koji dovode do promjena i malignosti stanica nisu u potpunosti poznati.

2.3. Metabolički putovi u stanicama raka

Metabolički se profil kancerogenih stanica aktivira prijenosom mitohondrijske oksidacijske fosforilacije na aerobnu glikolizu. Prekomjerna ekspresija transportera glukoze i glikolitičkih enzima upravo upućuje na abnormalan rad određenih stanica [7]. Ustanovljeno je i da glikoliza u većoj mjeri zadovoljava potrebe metabolizma raka, iako proizvodi znatno manje ATP-a (adenozin trifosfata) od oksidacijske fosforilacije. Neka od tih zbivanja se izravno tiču promjena procesa stanične smrti normalnih stanica i stanica raka, stoga dva glikolitička enzima uz laktat dehidrogenazu (LD) imaju ključnu ulogu u održavanju ravnoteže između stanične smrti i normalnog razvoja stanica; heksokinaza (HK) i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH) (Slika 2.).



Slika 2. Metabolički putovi u stanicama raka. Shematski prikaz zbivanja procesa glikolize, metabolizma masnih kiselina i glutamina u stanicama raka.

Izvor: Preuzeto i prilagođeno iz [7].

2.3.1. Glikoliza

Rast stanica raka usko je povezan s promjenama staničnog metabolizma. Zapravo, stanice raka se više oslanjaju na fermentaciju glukoze nego na metabolizam staničnog disanja čak i u prisutnosti kisika. Postoji više **glikolitičkih enzima** čija je aktivnost znatno povećana u tumorskom tkivu. To su heksokinaza, laktat dehidrogenaza A, kao i oblik M2 piruvat kinaze (PKM-2), enzima u završnom procesu glikolize, koji sudjeluje u prijenosu fosfatne skupine s fosfoenolpiruvata (PEP) na ADP (adenozin difosfat) pri čemu nastaje ATP, dok PEP zaostaje kao enolni oblik piruvata;

a. $2\ PEP + 2\ ADP \rightarrow 2\ ATP + piruvat$

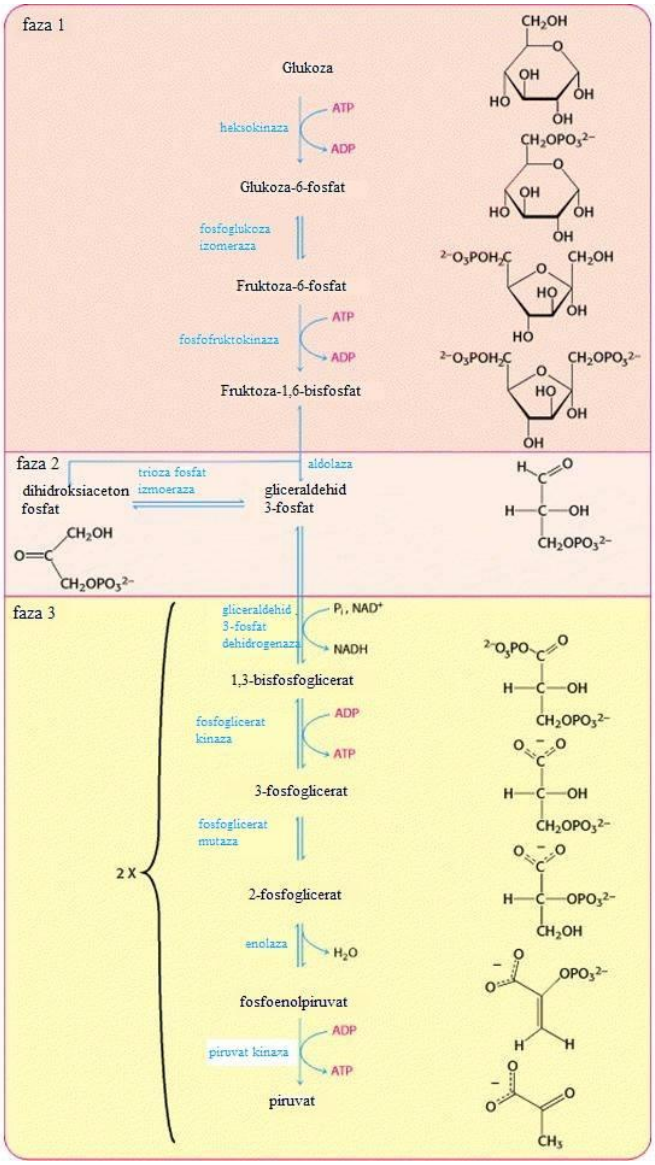
U raznim istraživanjima dokazana je povećana proizvodnja laktata i smanjena potrošnja kisika kada se radi o PKM-2, čiji princip regulacije potiče proces glikolize u stanicama raka. Općenito, glikoliza je glavni metabolički put razgradnje glukoze koji se događa u citosolu svih sisavaca. Najvažnije metaboličko gorivo je glukoza, najrasprostranjeniji monosaharid u prirodi. Također, glikoliza je glavni metabolički proces fruktoze,galaktoze i drugih ugljikohidrata iz hrane. Oslobođena energija iz navedenih šećera u procesu glikolize koristi se za sintezu spojeva bogatih energijom poput ATP i NADH (reducirani oblik nikotinamid adenin dinukleotida) [8].

Ukupna jednadžba glikolize glasi:

b. $glukoza + 2\ ADP + 2\ P_i \rightarrow 2\ laktat + 2\ ATP + 2H_2O$

Glikoliza se odvija u 10 koraka, od kojih su tri procesa izrazito egzergona,odnosno potpuno ireverzibilna, što znači da su kontrolna mjesta metabolizma (Slika 3). To su reakcije koje kataliziraju heksokinaza, fosfofruktokinaza (PFK), i piruvat kinaza (PK) (reakcije 1,3 i 10), te su one glavna mjesta regulacije glikolize. Regulacijom aktivnosti enzima upravljana je brzina razgradnje glukoze, ali nisu svi koraci za to jednako pogodni. Ta tri enzima kontroliraju glikolizu, a među njima ističe se fosfofruktokinaza koja katalizira slijedeću reakciju:

c. $fruktoza\text{-}6\text{-}fosfat + ATP \rightarrow fruktoza\text{-}1,6\text{-}bisfosfat + ADP$



Slika 3. Shematski prikaz glikolitičkog puta glukoze

Izvor: Preuzeto i prilagođeno iz [8].

Aktivnost fosfofruktokinaze alosterički je regulirana nizom efektora. Aktivatori su: ADP, AMP (adenozin monofosfat), cAMP (ciklički AMP), fruktoza-1,6-bisfosfat, fruktoza-2,6-bisfosfat, fruktoza-6-fosfat, amonijak, anorganski fosfat. Fosfofruktokinazu inhibiraju ATP, citrat i PEP. [8,9] O koncentraciji tih tvari ovisi kojom će se brzinom odvijati glikoliza i to vrijedi za sve stanice u organizmu. PFK-2 je enzim također u jetri i katalizira nastajanje fruktoze-2,6-fosfata pa pokreće glikolizu. Zapravo su fruktoza bisfosfataza-2 i fosfofruktokinaza-2 dva katalitička mjesta na jednom proteinu, ali ne mogu djelovati istodobno. Fosforilacija proteina aktivira fruktozu bisfosfatazu, a isključuje PFK.

Defosforilacija djeluje obrnuto. Aktivnosti ovih enzima reguliraju se reverzibilnim vezivanjem alosteričkih efektora ili kovalentnom modifikacijom [8].

Stanje smanjene količine kisika u tkivu i stanicama, što za posljedicu ima poremećaj u funkcioniranju određenih organa, sustava pa i stanica je hipoksija, koju tumor preživljava pojačanom aktivnošću glikolitičkog procesa i njezinih enzima. Nadalje, aktivnost prijenosnika glukoze u stanicu i kontrolu gena za glikolitičke enzime regulira hipoksijski inducibilni faktor-1 (HIF-1) tako da u hipoksičnim uvjetima stanice povećava aktivnost piruvat dehidrogenaze kinaze-1 (PDK-1) koja inhibira enzim u reakciji pretvorbe konačnog produkta glikolize, piruvata, u acetil-CoA, zvan piruvat dehidrogenaza (PDH). Na takav način se smanjuje povezanost dvaju procesa, glikolize i Krebsovog ciklusa. Reducirani piruvat se ne pretvara u acetil-koenzim A koji bi u reakciji s oksaloacetatom, intermedijerom kružnog procesa, dao citrat, prvi produkt u ciklusu limunske kiseline ili Krebsovom ciklusu.

Smanjenom koncentracijom glukoze u krvi dolazi do inhibicije ireverzibilnih procesa u glikolizi, što uzrokuje značajnu redukciju proizvodnje ATP-a, glavnog produkta glikolitičkog metabolizma. Takav redoslijed je najodgovorniji za smrt stanice ili apoptozu. Ta sudbina se može izbjeći aktiviranjem spojevima koji proizvode molekule ATP-a u metabolizmu masnih kiselina koji se odvija u mitohondrijima i/ili peroksisomima u četiri metabolička prijelaza.

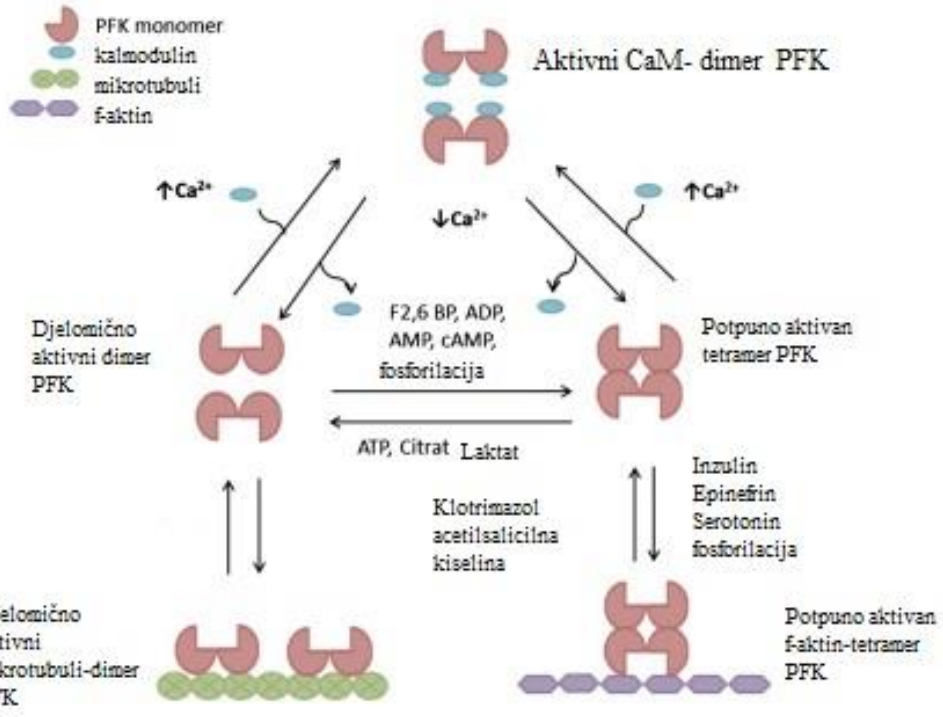
2.3.2. Heksokinaza

Heksokinaze (HK) su enzimi kod kojih razlikujemo četiri ljudska oblika pronađena u specifičnom tkivu. One kataliziraju prvi korak glikolize fosforiliranjem glukoze u glukoza-6-fosfat (G-6-P). Cilj ove reakcije je zarobiti G-6-P unutar stanice radi potrebe za ATP-om putem glikolize ili oksidativne fosforilacije, ili pak preusmjeravanjem metabolita u put pentoze fosfata radi biosintetskih reakcija [10]. Dva najistraženija oblika; HK-1 i HK-2 nalazimo u mozgu, mišićima i jetri. Oba su izražena u tumorskim stanicama, međutim, HK-2 se pojavljuje učestalije od HK-1. Pokazuje vrlo visok afinitet za svoj supstrat, te iskorištava mitohondrijski ATP kako bi se povećala potreba za glikolizom u stanicama raka [5]. Nadalje, studije su potvrdile sposobnost spomenutih heksokinaza u sprječavanju mitohondrijske apoptoze izravnim djelovanjem ili interakcijom sa specifičnim membranskim proteinima [6]. Proučavajući HK-1 i HK-2, gdje oba enzima imaju ekvivalentne dvije domene, samo HK-2 ima katalitičku aktivnost u objema domenama [10]. Navedeni enzimi su inhibirani produktom reakcije koju kataliziraju, glukozom-6-fosfat. Također, veliki broj manjih

molekula se očituju kao inhibitori heksokinaze, poput BrPyr i 2-deoksiglukoze (2dG). 2dG se ponaša kao kompetitivni inhibitor što znači da se natječe sa supstratom za vezanje u aktivnom mjestu heksokinaze, te se fosforilira preko glikolitičkih transportera u 2-dG-6-fosfat (2-dG-6P) [11]. Ovakav primjer inhibicije HK može dovesti do smrti stanice raka, a primarno do usporenja glikolize i redukcije ATP-a. Osim što je HK ključna za metabolizam većine malignih tumora, smatra se da su mitohondrijske interakcije sa HK neophodne za liječenje raka signalnim putevima povezanih sa apoptozom [3].

2.3.3. Fosfofruktokinaza

PFK je enzim koji fosforilira fruktozu-6-fosfat (F-6-P) u glikolizi. Dolazi do prijenosa fosforilne grupe s ATP-a i nastaje fruktoza-1,6-bisfosfat (F-1,6-bisP). To je ključni regulatorni korak u glikolitičkom putu i ujedno druga ireverzibilna reakcija. PFK nalazimo kao homotetramer u sisavcima i bakterijama (tako što svaki monomer sadrži dvije slične domene) i kao oktamer, ali je sintetiziran kao nestabilni inaktivni monomer [12]. PFK je prvo otkrivena u sisavcima i to u mišićima kao PFK-M, u jetri kao PFK-L i PFK-P u plazmi. U jednom su istraživanju otkrili povezanost PFK-L sa agresivnim tumorskim stanicama [11]. Fosfofruktokinaze pokazuju jednu od najkompleksnijih regulacija u glikolizi. Ovisne su o kalcij-vezujućem proteinu, kalmodulinu, (CaM) koji može biti snažno inhibiran kada su oba aktivna mjesta zauzeta, što stabilizira dimernu formu PFK. Aktivacija CaM vezanog na dimer PFK nezavisno su inhibirani citratom, ATP-om, alosteričkim inhibitorima i laktatom,a stimulirani ADP-om i F-2,6-bisP (Slika 4.). PFK-1 se aktivira fruktozom-2,6-bisfosfatom (F-2,6bisP), ADP/AMP i amonijevim solima a inhibirana je ATP-om i citratom koji predstavlja ulaz u ciklus limunske kiseline. Tetramerni kompleks zvan PFK2 sintetizira F-2,6-bisP. Nadalje, amonijak nastaje deaminacijom glutamina te djeluje kao alosterički aktivator PFK1. Važnost te aminokiseline leži u sposobnosti doniranja dušikovog i ugljikovog atoma procesima koji podržavaju ubrzani rast stanica, stoga glutamin djeluje kao nutrijent u stanicama raka [13]. Bez prevelike kontrole PFK nad zdravim tkivom, inhibicijom pojedinih domena PFK mogla bi se usporiti upotreba glukoze i proizvodnja laktata [11].



Slika 4. Shematski prikaz regulacije aktivacije i inhibicije PFK. Pri visokim koncentracijama Ca^{2+}, vezanje kalmodulina na aktivno mjesto PFK stabilizira i aktivira dimerski oblik. Ako je unutarstanična koncentracija Ca^{2+} smanjena, kalmodulin disocira sa PFK, te dimer PFK postaje djelomično aktivan. Kao supstrat, ATP inhibira PFK, te laktat pojačava taj učinak, dok ADP, AMP,cAMP i F-2,6-bisP djeluju aktivirajuće. Hormoni poput inzulina, serotonina i epinefrina pojačavaju vezi između tetramerskog PFK i f-aktina što potpuno aktivira enzim. Izvor: preuzeto i prilagođeno iz [11].

2.3.4. Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza

GAPDH je multifunkcionalni i ključni glikolitički enzim koji katalizira prvi korak puta u kojem se proizvodi ATP. Gliceraldehid-3-fosfat (GA-3-P) se dehidrogenira (uklanjanje vodika) pomoću GAPDH, enzima ovisnog o NAD^+-u. NAD^+ prima vodik koji se oslobađa, a na dehidrogenirani produkt se dodaje anorganski fosfat i konačno nastaje 1,3-bisfosfoglicerat. Osim u citosolu, GAPDH je također pronađen u jezgri i mitohondriju ili je vezan na membrane (Golgijev aparat, endoplazmatski retikulum, stanična membrana). Enzim je pojačano eksprimiran u različitim ljudskim stanicama raka i biopsijama abnormalnog tkiva, najviše u dojci, prostati, plućima i gušterači [6]. Pojava više aktivnih mjesta u domenama enzima i određene konformacije enzima zaslužne su za multifunkcionalnost GADPH. Općenito, kada se radi o agresivnom raku ili je metastazirao, pojavljuju se dramatično povišene razine glikolitičkih enzima, pa tako i GAPDH. Ovaj je enzim opisan kao regulator

stanične smrti. Međutim, njegova uloga u tom području nije potpuno jasna; neke studije pokazuju proapoptotska svojstva, dok drugi ukazuju na zaštitnu ulogu i sudjelovanje u napredovanju tumora [13].

Nadalje, jedno istraživanje je pokazalo da ovaj glikolitički enzim može biti S-nitroziliran sa dušikovim (ll) oksidom, što uzrokuje vezanje na protein Siah1 koji djeluje kao ubikvitin ligaza. Takav kompleks odlazi u jezgru kancerogene stanice gdje Siah1 uzrokuje degradaciju jezgrenih proteina, te inicijaciju stanične smrti [13].

2.3.5. Fosfoglicerat mutaza

Osmi korak glikolize katalizira enzim fosfoglicerat mutaza (PGM). Odgovoran je za prijenos fosfatne grupe sa C-3 na C-2 , što dovodi do pretvorbe 3-fosfoglicerata (3-PG) u 2-fosfoglicerat (2-PG). To je reverzibilna reakcija, a osim nje, PGM može katalizirati i pretvorbu fosfoenolpiruvata (PEP) u piruvat (PIR) pri visokim koncentracijama PEP-a, što osigurava ubrzan proces glikolize. Supstrat PGM, 3-PG, može inhibirati put pentoze fosfata, metaboličkog puta kojim stanice proizvode šećere s pet ugljikovih atoma i reducirani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH). Također, pronađen je inhibitor nazvan PGMI-004A koji povećava koncentraciju 3-PG a smanjuje 2-PG u stanicama raka, čime se značajno usporava glikoliza, put pentoze fosfata kao i biosinteza i rast tumora [1].

2.3.6. Piruvat kinaza

Enzim koji u posljednjem koraku aerobne glikolize katalizira prijelaz PEP-a u PIR, pri čemu nastaje energijski važan ATP je piruvat kinaza (PK). Za ovu gotovo ireverzibilnu reakciju potrebni su i kofaktori K^+ ioni i Mg^{2+} ioni [8]. Enzim je prisutan u svim stanicama, ali je osobito važan za život eritrocita s obzirom da im je potrebna glukoza za održavanje svojih funkcija. U toj reakciji i dobivaju se dvije molekule ATP-a iz ADP-a.

PK je enzim prepisan s jednog gena smještenog na kromosomu 15 te ima dva oblika koja su vrlo bitna za metabolizam raka. PKM-1 je oblik koji se nalazi u normalnom tkivu, i ima najniži K_M za PEP, dok PKM-2 ima nizak afinitet za PEP i bezuvjetno je aktivan u abnormalnom tkivu uz PKM-1 [11]. Štoviše, PKM-2 sadrži alosterička vezna mjesta koja su regulirana glikolitičkim intermedijerom fruktozom-1,6-bisfosfatom (F-1,6-bisF), tako što inaktivni dimer prelazi u aktivni tetramerni oblik. Reducirana proizvodnja laktata je

primijećena kada je M-2 oblik blokiran, a M-1 oblik je dosegao maksimalnu enzimatsku aktivnost [6]. Zato se smatra da upravo PKM-2 može imati najveći utjecaj na metabolizam tumora.

Stanice raka otkrivaju veliku razinu oblika M2 piruvat kinaze. Prijelaz u manje učinkoviti oblik omogućava veću količinu laktata. Nekoliko studija je istraživalo utjecaj PKM-2 na staničnu smrt i pokazano je da enzim pridonosi očuvanju stanica uz pomoć Bcl-xL ili HIF-1. Bcl-xL je transmembranski protein koji sudjeluje u zaštiti membrane, te sprječava otpuštanje određenih molekula, poput citokroma c. Ova svojstva ukazuju na antiglikolitičku funkciju PKM-2 djelujući kao tirozin kinaza [6].

2.4. Mitohondrij i njegova središnja uloga u apoptozi

Gotovo sve stanice živih organizama, osim nekih iznimaka, u svojoj citoplazmi sadrže mitohondrije. To su sićušne strukture, morfološki jednostavne, ali funkcionalno vrlo komplicirane. Te stanične organele koje služe kao izvor stanične energije, je ujedno i mjesto aktivnosti Krebsovog ciklusa te mjesto stvaranja ATP-a oksidativnom fosforilacijom. Izgledom su ovalne, zaštićene dvostrukom ovojnicom od kojih je vanjska glatka, dok je unutrašnji sloj bogato nabran, ima produžetke prema unutrašnjosti mitohondrija pa kažemo da tvori krista. Mitohondrijalni matriks je mjesto između tzv. listova membrane i unutar samog mitohondrija. Između dva sloja opne zbivaju se brojni, za život ključni procesi. Membrane mitohondrija, kao i ostale membrane, građene su od lipida i proteina. Naprimjer, mijelinske ovojnice živaca sadrže 25% proteina a 75% lipida,dok unutrašnji sloj mitohondrijalne membrane sadrži 20% lipida i 80% proteina. S promjenom aktivnosti stanice variraju i broj i velićina mitohondrija. Pojačani rad prati umnožavanje mitohondrija, a i njihovo povećanje. Vanjski sloj membrane propustan je za većinu manjih iona i molekula, dok su specijalizirani nosači molekula odgovorni za prolaz kroz unutarnji sloj te oni putuju u mitohondrij ili obrađene izlaze iz mitohondrija u citosol ili protoplazmu stanice.

Mitohondrij se smatra središnjim regulatorom apoptoze, programirane stanične smrti. Stanice pokreću apoptozu u sklopu različitih fizioloških procesa ili zbog patoloških oštećenja stanica (uzrokovanih različitim vanjskim i unutrašnjim čimbenicima), zbog čega postaju opasne i/ili nekorisne za organizam [7].

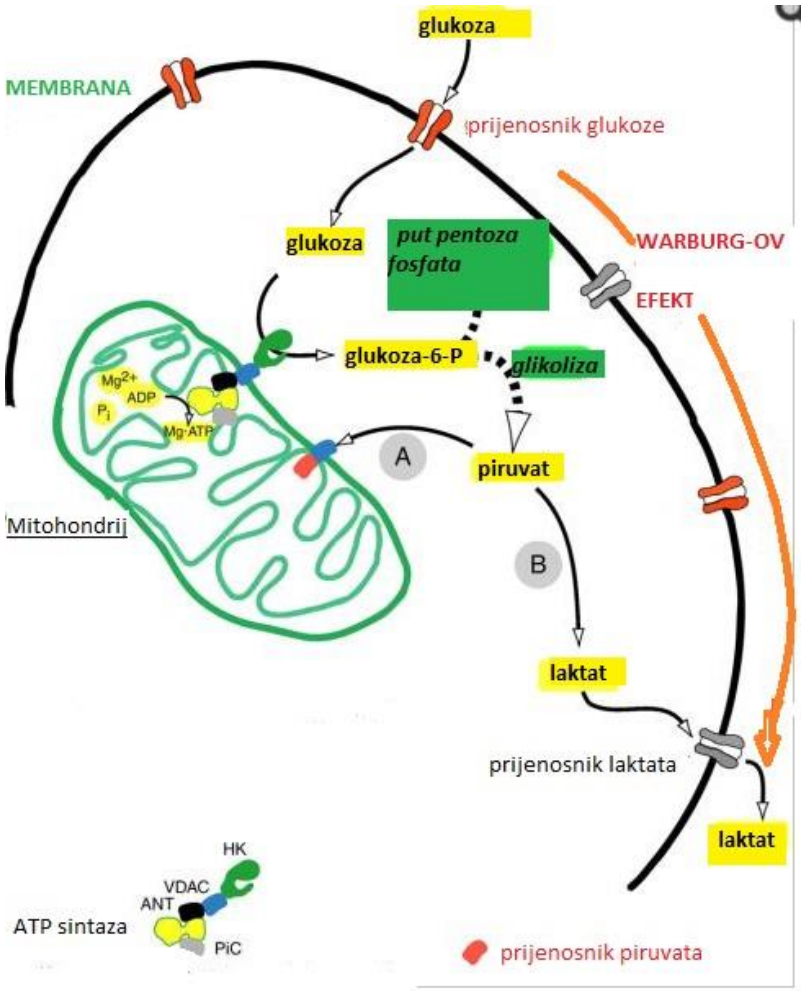
Mitohondriji su uključeni i u druge biološke procese osim sinteze ATP-a, poput oksidacije masnih kiselina, Krebsovog ciklusa, ili proces oksidativne dekarboksilacije piruvata do acetil-CoA. Osim središnje uloge u metaboličkom sustavu, najnovija istraživanja pokazuju povezanost sa programiranom smrti stanice. Mitohondrij se ponaša kao kontrolno mjesto koje registrira niz različitih signala poput koncentracije metabolita i iona od strane signalnih molekula; kinaza i fosfataza ili drugih nutrijenata i molekule kisika. Ukoliko čimbenici smanjenja rasta tumorskih stanica izostanu, glikoliza se aktivira, smanji se potrošnja kisika, kao i proizvodnja adenozin trifosfata, te dolazi do redukcije sinteze proteina. Takav slijed događaja vodi do pojačane ekspresije apoptoze.

2.5. Warburg-ov efekt

Korelaciju između mitohondrija i rasta i razvoja raka proučavao je Otto Warburg, njemački biokemičar, te mu je njegovo istraživanje o metabolizmu raka donijelo Nobelovu nagradu 1931. godine. Njegovo opažanje o aerobnoj glikolizi pri velikim brzinama poznato je kao ***Warburg-ov efekt***. Prvi je uočio potrebu tumora za glukozom i u hipoksijskom okruženju prevodeći produkt glikolize, piruvat, u laktat. Međutim, za razliku od normalnih stanica, gdje se ATP sintetizira putem anaerobne glikolize, primjerice tijekom veće mišićne aktivnosti, povratak u uobičajene biološke uvjete ne uzrokuje značajan prijelaz laktata u piruvat u tumorima [10]. Stanice raka će prije sintetizirati vlastiti ATP (iako manje učinkovito) glikolizom, smanjujući njihovo oslanjanje na oksidativnu fosforilaciju čak i u prisutnosti dovoljne količine kisika (Slika 5.).

Nedavne studije temeljene na hipotezi Otto Warburga, koju je postavio 1922.godine, pokazale su da nepravilan rad mitohondrija i zakašnjela upotreba glukoze u stanici mogu voditi do razvoja raka. Također, uočena je povišena razina heksokinaze-2, enzima koji aktivira glikolitički proces. Taj enzim koji katalizira ireverzibilnu reakciju je vezan na mitohondrij te je ključan za Warburg-ov efekt [14]. Nadalje, već spomenuti oblik PKM-2 se aktivira na kraju glikolitičkog procesa, defosforilirajući PEP u piruvat. Opaženo je da PKM-2 ima manju enzimatsku aktivnost od PKM-1, enzima koji je uobičajeno nađen u normalnim i zdravim stanicama. Između ostalog, postoje i drugi enzimi u glikolizi koji potiču metabolizam u stanicama raka [15].

Kako god, nove tehnologije su omogućile detaljniju istragu i analizu metabolizma raka i bolje razumijevanje načina kako tumorske stanice primijenjuju glikolizu, čija je brzina značajno veća čak i u aerobnim uvjetima, za razliku kod normalnih stanica.



Slika 5. Metabolički put glukoze u glikolitičkim tumorskim stanicama
Izvor: Preuzeto i prilagođeno iz [10].

2.6. Metode analize metaboličkih putova u stanicama raka

Na temelju svih istraživanja provedenih na području metabolizma stanica raka jasno je da je prijeko potrebna detaljna analiza mehanizma rasta i razvoja takvog tkiva,kao i metabolomi koji sudjeluju. Također, za razliku od proteina i gena, koji su linearni polimeri i sadrže odgovarajući broj aminokiselina i monomera, tumorski metaboloni se sastoje od mnogo strukturno različitih molekula raznih fizikalno-kemijskih svojstava. Mogu se analizirati kombiniranim analitičkim metodama i multivarijatnim statistikama analize među kojima su najbitnije nuklearna magnetska rezonancija (NMR) , plinska kromatografija (GC), tekuća

kromatografija (LC) i masena spektrometrija (MS). I NMR i MS su nepohodni alati za sistematsko profiliranje prognoze i dijagnoze tumora pomoću fizioloških tekućina, urina i plazme. [6]

2.6.1. NMR spektroskopija

NMR analiza metaboloma se bazira na ^{1}H i ^{13}C NMR spektroskopijama iako se koristi i ^{31}P NMR spektroskopija za mjerenje visoko energijskih fosfata u metabolomima i fosforiliranim lipidima. To je apsorpcija radiofrekvencijskog zračenja od strane jezgre u jakom magnetnom polju. Apsorpcija zračenja prouzrokuje izjednačavanje spinova jezgara ili brzi prijenos na viši energijski nivo. Nakon prestanka zračenja jezgre otpuštaju (emitiraju) apsorbiranu energiju radiofrekvencijskog zračenja i vraćaju se u stanje niže energije.

NMR spektar dobiven analizom metabolita je vrlo složen, jer se radi o tisućama signala koji dolaze od različitih spojeva. No, može se odrediti kvalitetna strukturalna identifikacija pojedinog metabolita sa 1D i 2D spektrom, za razliku od ostalih metoda, npr. MS; ova spektroskopska metoda ima slabu osjetljivost, no to se može poboljšati primjenom jačeg magnetskog polja i duže provedbe analize. [7]

2.6.2. Plinska kromatografija, tekuća kromatografija, masena spektrometrija

Mobilna faza u GC je u plinovitom stanju, a stacionarna faza može biti tekuća ili čvrsta. Mobilna faza nosi komponente smjese kroz stupac kromatografa, a prije uvođenja u stupac, uzorak se mora pretvoriti u plinovito stanje. A LC se koristi za razdvajanje komponenti iz smjese na osnovi kemijskih interakcija između tvari koja se analizira i stacionarne faze u stupcu. Princip rada LC-a je forsiranje prolaska analizirane tvari ili smjese kroz stupac (cijev punjenu materijalom sačinjenim od sitnih čestica, a time i velike površine) pumpanjem tekućine, koja je mobilna faza u ovom slučaju, pod visokim tlakom kroz sam stupac. I GC-MS i LC-MS metode uključuju prvi kromatografski korak pri kojem su metaboliti odvojeni u plinovitoj fazi ili tekućoj fazi, zatim su ionizirani u pozitivne ili negativno nabijene čestice u drugom koraku, i zatim raspoređene prema njihovom naboju i masi. Ta tri koraka pomažu pri njihovoj identifikaciji.

3. Zaključak

Iako rak gledano kroz povijest smatraju poremećajem proliferacije, mnoga istraživanja pokazuju da bi se trebao smatrati metaboličkom bolešću. Metabolizam stanica raka uvijek uključuje povećanu upotrebu glukoze i glutamina, ubrzan rad glikolize, te konformacijske promjene enzima kao i uvećanu proizvodnju laktata. Obilje literature ukazuje na apoptozu kao ključnu ulogu u borbi protiv raka, te se mnoga saznanja upravo istražuju na kliničkom ispitivanju. Također, bilo bi povoljnije kada bi se otkrila jedna molekula ili jedan metabolički put koji bi ciljano usmjerili apoptozu na maligne stanice, a ne zdrave, jer trenutno znamo za više molekula iz Bcl obitelji koje se koriste u kombiniranoj terapiji, ali im je djelotvornost nedovoljna. Nakon više od 80 godina od Warburg-ovog proučavanja metabolizma stanica, jasno je da su enzimi glikolitičkog puta budućnost onkologije. Stručnjaci moraju nastaviti s istraživanjem njihovih potencijala u razvoju kemoterapije i lijekova za liječenje raka. Inhibicija glikolize, dakle inhibicija PFK, HK, PKM-2 i ostalih glikolitičkih enzima mogla bi postati podloga za otkrivanje uzroka i terapeutskih mogućnosti. I iako su znanstvenici učinili veliki napredak u shvaćanju tako opake bolesti i razvoju terapije, uvijek će postojati rizik od razvoja malignih stanica.

4. Literatura

1. M. O. Warmoes, J. W. Locasale. Heterogeneity of glycolysis in cancers and therapeutic opportunities, *Biochem. Pharmac*. **92** (2014) 13,16-17
2. S. Patel, S.Ahmed. Emerging field of metabolomics: Big promise for cancer biomarker identification and drug discovery, *JPBA* **107** (2015) 63–74
3. V.Žlender. Apoptoza-programirana smrt stanice, *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **54** (2003) 267-274
4. R. S. Wong. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **30** (2011) 87
5. A. Lutterotti, T. Berger, M. Reindl. Biological markers for multiple sclerosis. *Curr. Med. Chem.* **65** (2007) 14
6. C. Cerella, M. Dicato, M. Diederich. Modulatory roles of glycolytic enzymes in cell death, *Biochem. Pharmac.* **92** (2014) 2-7
7. F. Chiaradonna, R.M. Moresco, C. Airoldi, D. Gaglio, R. Palorini, F. Nicotra, C. Messa, L. Alberghina. From cancer metabolism to new biomarkers and drug targets, *Biotech. Advanc*. **30** (2012) 31,40-41
8. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013.
9. D. Nelson, A. Lehninger, M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 2008.
10. S. P. Mathupala, Y. H. Ko, and P. L. Pedersen. Hexokinase-2 bound to mitochondria: Cancer's stygian link to the "Warburg effect" and a pivotal target for effective therapy, *Seminar Cancer Biology* **19** (2009) 17-24
11. N. Al Hasawi, M. Al Khandari, Y. A. Luqmani. Phosphofructokinase: A mediator of glycolytic flux in cancer progression, *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* **92** (2014) 3-6
12. C. T. Hensley, A. T. Wasti, R. J. DeBerardinis. Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities, *J. Clin. Invest.* **123** (2013) 3678–3684
13. G. S. Krasnov, A. A. Dmitriev, A. V. Snezhkina, A. V. Kudryavtseva. Deregulation of glycolysis in cancer: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as therapeutic target, *Exp. Op. Therap. Targ.* **17** (2013) 682-686
14. J. A. Hess, M. K. Khasawneh. Cancer metabolism and oxidative stress: Insights into carcinogenesis and chemotherapy via the non-dihydrofolate reductase effects of methotrexate, *BBA Clinical* **3** (2015) 152–161

15. P. S. Ward, C. B. Thompson. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate, *Cancer Cell* **21** (2012) 297-300

Web izvori:

16. http://www.medicalnewstoday.com/articles/249141.php (1.9.2015.)
17. http://pathology.jhu.edu/pc/BasicTypes1.php?area=ba (3.9.2015.)