

METABOLISMUS GLUTAMINU A JEHO ROLE V TERAPII NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

NIKOLA VRZÁČKOVÁ, TOMÁŠ RUML
a JAROSLAV ZELENKA

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha
jaroslav.zelenka@vscht.cz

Došlo 4.6.19, přijato 4.3.20.

Klíčová slova: glutamin, terapie nádorových onemocnění,
metabolismus

Obsah

1. Úvod
2. Glutamin a jeho metabolismus
 - 2.1. Vstup glutaminu do buňky
 - 2.2. Anabolismus
 - 2.3. Buněčná signalizace
 - 2.4. Účast na antioxidační ochraně buňky
 - 2.4.1. Syntéza glutathionu
 - 2.4.2. Regenerace redukované formy nikotinamidadeninukleotidfosfátu
3. Syntéza glutaminu
4. Uplatnění glutaminu v terapii nádorových onemocnění
 - 4.1. Inhibice transportu glutaminu
 - 4.2. Cílení na glutamínasu
 - 4.3. Cílení na glutamátdehydrogenasu a aminotransferasy
 - 4.4. Asparaginasa
5. Závěr

1. Úvod

Nádorová onemocnění představují heterogenní skupinu chorob lišících se individuálním genetickým profilem, jehož součástí je aktivace různých onkogenů, a naopak ztráta funkce některých tumor-supresorových genů. Kvůli této vysoké heterogenitě je cílená terapie nádorových onemocnění možná jen na základě určení genetického profilu. Heterogenita a rychlejší akumulace mutací je zodpovědná také za častou získanou rezistenci k léčbě. Nádorová tkáň se však od nenádorové liší i svým metabolismem. Zatímco metabolismus diferencovaných buněk je orientován na hospodárné využití substrátů pro konkrétní účel, intenzivně proliferující nádorová buňka transformuje svůj metabolismus tak, aby naplnila potřebu stavebních jednotek pro syntetické účely bez ohledu na zbytek organismu. Cílení

protinádorové terapie na transformovaný metabolismus nádorových buněk se stalo důležitou součástí onkologického výzkumu, vzhledem k mnoha společným metabolickým znakům napříč nejrůznějšími nádorovými onemocněními¹.

Glukosa je obvykle považována za hlavní živinu nádorových i nenádorových buněk. Představuje tedy primární cíl terapie zaměřené na metabolismus nádorových buněk. Dalším potenciálním cílem je glutamin, který slouží jako zdroj energie, uhlíkové kostry i aminoskupin a tím se účastní celé řady aspektů nádorového metabolismu u velkého počtu různých typů nádorových buněk. Toho pak může být využito v terapii o to efektivněji².

2. Glutamin a jeho metabolismus

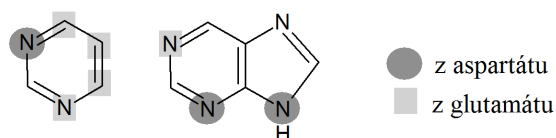
L-Glutamin (dále jen glutamin) je neesenciální aminokyselina, která se svou koncentrací 0,4–0,7 mmol l⁻¹ řadí na pozici nejhojnější aminokyseliny v krevním řečišti³. Glutamin má v buňce řadu funkcí. Jeho základní role můžeme rozdělit do několika skupin: účast na anabolismu, zapojení do energetického metabolismu a role v antioxidační ochraně buňky. Z hlediska anabolismu je glutamin substrátem při syntéze proteinů, nukleotidů a je také přeměňován na další aminokyseliny⁴. Glutamin je též významným anaplerotickým substrátem citrátového cyklu, který dále slouží jako zdroj energie a substrátů pro anabolický metabolismus nádorových i nenádorových buněk⁵. Nesmírně důležitá je role glutaminu v antioxidační ochraně buňky, na které se podílí jakožto substrát pro syntézu glutathionu a pro regeneraci redukované formy nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADPH) (cit.^{4,6}). Přestože glutamin patří mezi neesenciální aminokyseliny, většina nádorových linií není schopná přežít v médiu bez glutaminu. Tento jev je označován jako „glutaminová závislost“⁷.

2.1. Vstup glutaminu do buňky

Glutamin nemůže vzhledem ke své hydrofilní povaze volně přecházet buněčnou membránou a pro jeho transport do buňky jsou zapotřebí transmembránové přenašeče. Přestože přenašečů glutaminu bylo identifikováno několik, žádný z nich nebyl označen za selektivní pouze pro glutamin⁸. Přenašeče glutaminu řadíme do rodiny SLC (z angl. solute carrier), konkrétně pak do skupin SLC1, SLC6, SLC7 a SLC38 (cit.³). Převážná většina z nich pracuje na základě Na⁺-gradientu, který je vytvářen sodno-draselnou pumpou⁹. Po vstupu do buňky je značná část glutaminu dále transportována do mitochondrie, jejíž vnitřní membrána je také selektivní a musí tedy obsahovat specifické přenašeče. Nicméně konkrétní přenašeče glutaminu na mitochondriální membráně nebyly dosud identifikovány¹⁰.

2.2. Anabolismus

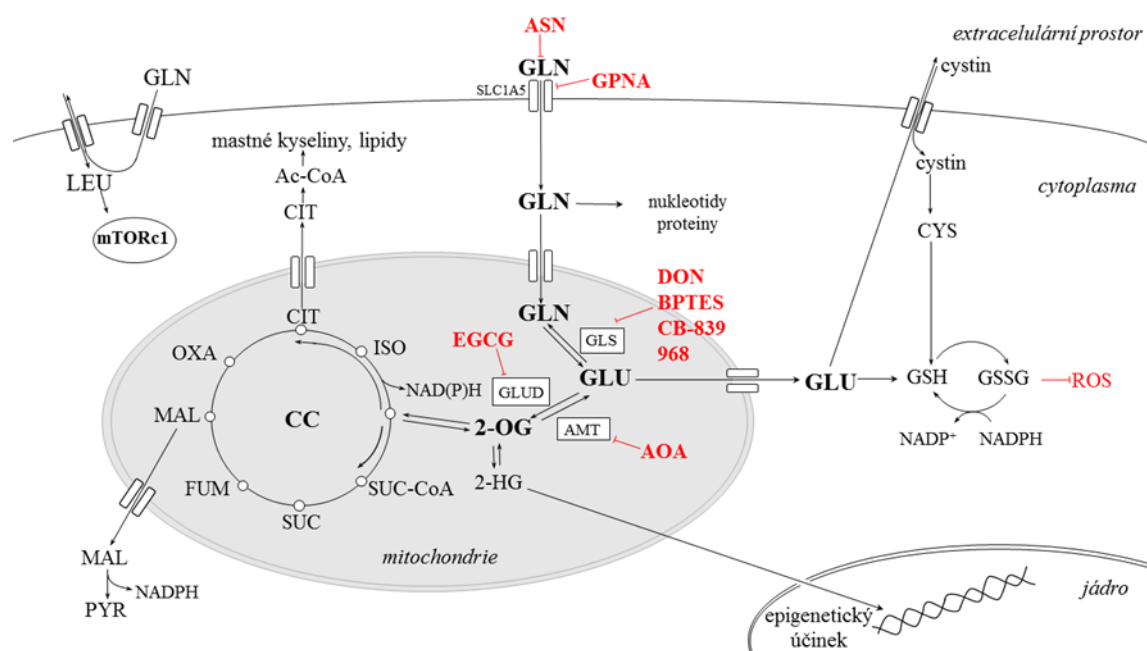
Kromě toho, že je glutamin jednou z kódovaných aminokyselin účastnících se proteosyntézy, je rovněž přeměňován na některé neesenciální aminokyseliny. Jeho γ -atom dusíku je nezbytný pro syntézu purinových i pyrimidinových bází, což glutamin přímo spojuje s procesem syntézy DNA a RNA (cit.¹¹). Při syntéze purinových bází je využívána amidová skupina glutaminu ve dvou krocích a při jedné reakci jejich syntézy je rovněž využíván aspartát, který často vzniká právě přeměnou z glutaminu. Při syntéze pyrimidinových bází je též využita amidová skupina glutaminu, a to hned v prvním kroku. Glutamin je rovněž donorem amidové skupiny při přeměně uridinu na cytidin. Zapojení glutaminu a aspartátu do puri-



Obr. 1. Podíl glutaminu a aspartátu na syntéze purinových a pyrimidinových bází. Základní pyrimidinová struktura vlevo a purinová struktura vpravo

nové a pyrimidinové struktury je zobrazeno na obr. 1. V souvislosti s touto problematikou bylo prokázáno, že nízké hladiny glutaminu brzdí přechod buněk do S-fáze buněčného cyklu¹². Za zmínku rovněž stojí, že aminoskupiny až 50 % neesenciálních aminokyselin potřebných pro syntézu proteinů pocházejí právě z glutaminu¹³ a řada esenciálních aminokyselin se do nádorové buňky dostává antiportní výměnou za glutamin¹⁴.

Vzhledem k tomu, že glukosa je v nádorových buňkách spotřebovávána především pro rychlou syntézu ATP prostřednictvím glykolýzy, a to i za přítomnosti kyslíku (Warburgův efekt)¹⁵, je pro uspokojení rychlé proliferace nutné využít další živiny v čele s glutaminem, který doplní rychle spotřebovávané meziproducty citrátového cyklu a poskytne ATP cestou oxidační fosforylace¹⁶. Katabolismus glutaminu, zobrazený na obr. 2, který je označován jako glutaminolýza, je proto z hlediska nádorového metabolismu klíčový¹⁷. Prvním krokem v tomto procesu je deaminace glutaminu zprostředkovaná mitochondriální glutaminasou (GLS), enzymem, který je u nádorových buněk produkovan v podstatně větším množství než u buněk nenádorové povahy¹⁸. GLS existuje ve dvou isoformách, jež jsou označovány jako ledvinový typ (GLS1) a jaterní typ (GLS2). Zatímco produkce GLS2 je vázána především na játra, GLS1 je distribuován po celém organismu.



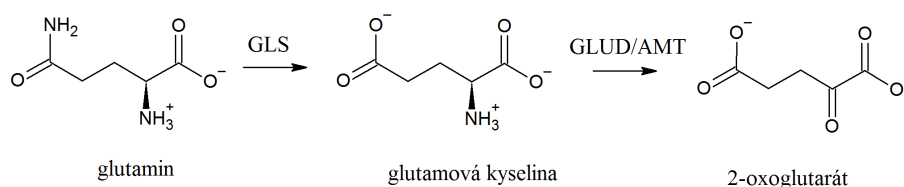
Obr. 2. Přeměny glutaminu po vstupu do buňky a jeho zapojení do buněčného metabolismu. Ac-CoA – acetyl-CoA, AMT – aminotransferasa, AOA – aminoxyoctová kyselina, ASN – asparaginasa, BPTES – bis[2-(5-fenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl]sulfid, CIT – citrát, CYS – cystein, DON – 6-diazo-5-oxy-L-norleucin, EGCG – epigallokatechin galát, FUM – fumarát, GLN – glutamin, GLS – glutaminasa, GLU – glutamát, GLUD – glutamátdehydrogenasa, GPNA – γ -L-glutamyl-*p*-nitroanilid, GSH – redukovaná forma glutathionu, GSSG – oxidovaná forma glutathionu, 2-HG – 2-hydroxyglutarát, ISO – isocitrát, LEU – leucin, MAL – malát, mTORc1 – mTOR komplex 1, 2-OG – 2-oxoglutarát, OXA – oxalacetát, PYR – pyruvát, ROS – reaktivní kyslíkové sloučeniny, SUC – sukcinát, SUC-CoA – sukcinyl-CoA (upraveno dle cit.⁴)

L-Glutamát (dále jen glutamát) je v mitochondrii deaminován na 2-oxoglutarát. Tato reakce může být katalyzována několika enzymy, mezi něž řadíme glutamátdehydrogenasu (GLUD) a dále aminotransferasy (AMT): glutamát-oxalacetáttransaminasu 2, známou též pod názvem aspartát-aminotransferasa, glutamát-pyruváttransaminasu 2, nazývanou též alaninaminotransferasa, a fosfoserinaminotransferasu^{4,19}. Takto vznikající 2-oxoglutarát vstupuje do citrátového cyklu⁴. Syntéza glutamátu a 2-oxoglutarátu z glutaminu je souhrnně zobrazena na obr. 3.

Prekvapivým a velmi významným zjištěním posledního desetiletí byla skutečnost, že 2-oxoglutarát může být přeměňován nejen na sukcinyl-CoA, ale rovněž na isocitrát takzvanou zpětnou dráhou citrátového cyklu. Tato reakce, katalyzovaná isocitrátdehydrogenasou, která má svůj analog v mitochondrii i cytoplazmě, bývá označována jako reduktivní karboxylace²⁰. Objevení zpětné dráhy citrátového cyklu je důkazem toho, že ačkoli jsou centrální metabolické pochody známy již desítky let, stále je zde prostor pro nové objevy.

Studie Wise a spol. poukázala na zajímavou skutečnost, že zpětná dráha citrátového cyklu je nádorovými buňkami využívána v případě hypoxie, při které je velká část citrátů syntetizována nezávisle na glukose²¹. Citrát je následně exportován do cytoplazmy, kde je využíván především pro syntézu lipidů^{21,22}, což je obzvláště žádané u nádorových buněk, které preferují *de novo* syntézu lipidů před přímým použitím lipidů z extracelulárního prostředí²³.

Nekarboxylovou redukcí 2-oxoglutarátu může navíc vznikat 2-hydroxyglutarát, jehož koncentrace bývá v nádorové tkáni podstatně vyšší než v případě tkáně nenádorové. Syntéza 2-hydroxyglutarátu může být výrazně zvýšená v případě, že se v aktivním místě isocitrátdehydrogenasy vyskytne mutace. Záměna jediné aminokyseliny pak může vést jednak k narušení schopnosti enzymu katalyzovat přeměnu isocitrátu na 2-oxoglutarát a rovněž ke zmíněné redukcí 2-oxoglutarátu na 2-hydroxyglutarát. Akumulovaný 2-hydroxyglutarát nepřímo epigeneticky ovlivňuje i signalizaci transformované buňky a způsobuje vyšší agresivitu onemocnění²⁴. Jeho účinek je spojen s klíčovou rolí 2-oxoglutarátu jako substrátu methylcytosindioxygenasy Tet2 účastníci se demethylace DNA a dioxygenasy Jumanji účastníci se demethylace histonů. Nahromaděný 2-hydroxyglutarát působí jako kompetitivní inhibitor obou těchto enzymů, což vede k vyššímu stupni methylace histonů a DNA v buňce a s tím souvisejícímu vlivu na genovou expresi a buněčné dělení²⁵.



Obr. 3. **Centrální reakce glutaminolýzy.** Přeměna glutaminu na glutamovou kyselinu a následný vznik 2-oxoglutarátu probíhající v mitochondrii. AMT – aminotransferasa, GLUD – glutamátdehydrogenasa, GLS – glutaminasa

2.3. Buněčná signalizace

Serin-threoninová kinasa označovaná zkratkou mTOR (z angl. mammalian target of rapamycin) je u savců zodpovědná za kontrolu buněčného růstu v závislosti na přítomnosti živin, růstových faktorů či energie²⁶. Tato kinasa je součástí složitějšího proteinového komplexu mTORc1, neboli mTOR komplexu 1, jehož deregulace je často nacházena v souvislosti s různými chorobami včetně nádorových onemocnění²⁷.

Aktivita mTORc1 souvisí s přítomností živin, především větvených aminokyselin. V prostředí bohatém na tyto aminokyseliny je komplex udržován v aktivním stavu, jenž stimuluje syntézu proteinů a zároveň inhibuje autofagii a apoptózu²⁸. Obdobný vliv na aktivitu mTORc1 má také inzulinová signalizace, konkrétně pak hromadění inzulinu²⁹. Za opačných podmínek je mTORc1 inaktivován, což následně vyvolá celou řadu buněčných změn. Mezi nejdůležitější patří potlačení buněčného růstu, proliferace a syntézy proteinů³⁰ a rovněž vyvolání autofagie, která slouží buňce jako alternativní cesta pro získávání aminokyselin³¹. Na aktivaci mTORc1 se nepodílejí pouze aminokyseliny, ale i celá řada proteinů signalizační kaskády³². Pro aktivaci komplexu musí být navíc mTORc1 navázán na povrch lysosomu, kde následně ovlivňuje fosforylaci vybraných regulátorů proteosyntézy a spouští tak celou řadu významných signalizačních kaskád³³.

V souvislosti s metabolismem glutaminu a aktivitou mTOR je zajímavá vzájemná interakce dvou přenašečů glutaminu, která je zobrazena na obr. 2. Pomocí prvního přenašeče je glutamin transportován do buňky, ze které může být s využitím odlišného přenašeče opět vylučován za současného importu jiné aminokyseliny³⁴. Leucin, jenž se tímto způsobem dostává do buňky, je významným aktivátorem mTORc1. Studie na mnoha buněčných liniích ukázaly, že deplece intracelulárního glutaminu vede k následnému snížení až zastavení importu leucinu, což se projeví inaktivací mTORc1 (cit.³⁵).

2.4. Účast na antioxidační ochraně buňky

2.4.1. Syntéza glutathionu

V nádorové tkáni jsou často zvýšené ukazatele oxidačního poškození, tedy důsledku oxidačního stresu, který je způsoben převahou oxidantů nad antioxidanty. Hlavní příčinou je zvýšená hladina reaktivních kyslíkových sloučenin (ROS), která může být důsledkem řady jevů zahrnu-

jičích zvýšenou metabolickou aktivitu, mitochondriální dysfunkci vyvolanou hypoxií, aktivitu peroxisomů, nekontrolovatelnou signalizaci cytokinů či růstových faktorů a změnu aktivity řady enzymů v čele s NADPH oxidasou. Vysoká hladina ROS v nádorové tkáni podněcuje buněčnou proliferaci, přežití a migraci a rovněž indukuje poškození DNA, přičemž tyto děje přispívají k selekci agresivnějších buněk. Nicméně vysoká hladina kyslíkových radikálů může rovněž vést k senescenci a buněčné smrti, čemuž se nádorová buňka brání zvýšenou hladinou antioxidantů³⁶. Jedním z hlavních nízkomolekulárních antioxidantů je tripeptid glutathion³⁷.

Glutathion neboli γ -glutamyl-cysteinyl-glycin má v buňce obdobně jako samotný glutamin mnoho funkcí, přičemž klíčová je především funkce antioxidantní a detoxikační⁶.

Syntéza glutathionu je dvoukroková a oba kroky vyžadují přísun ATP. V prvním kroku vzniká dipeptid složený z glutamátu a cysteinu za katalýzy γ -glutamyl-cysteinsynthetasy a v navazujícím kroku je ke vzniklému dipeptidu za katalýzy glutathionsynthetasy připojen glycin. Vznikající glutathion existuje v redukované (GSH) a oxidované (GSSG) formě. GSH odpovídá za reakci s volnými radikály a ROS, při které dochází k oxidaci glutathionu za vzniku GSSG, jenž je na GSH zpětně přeměňován NADPH-dependentní glutathionreduktasou³⁸. Souhrnně je tento proces zobrazen na obr. 2.

Volný glutathion se v buňce vyskytuje převážně v redukované formě a poměr GSH/GSSG za fyziologických podmínek běžně převyšuje hodnotu 100. Oproti tomu za podmínek oxidačního stresu tento poměr klesá na hodnotu mezi 1–10 (cit.⁶).

Limitující aminokyselinou pro vznik glutathionu je cystein, jehož intracelulární hladina může být vzhledem ke krátkému biologickému poločasu glutathionu rychle vyčerpána³⁹. V souvislosti s touto problematikou je významný přenašeč, který, jak je zobrazeno na obr. 2, zajišťuje výměnu intracelulárního glutamátu za extracelulární cystin, který se po přeměně na cystein může podílet na syntéze glutathionu či proteosyntéze^{8,40}. Spojitost mezi glutathionem a odolností buněk k oxidačnímu stresu byla pozorována již v 90. letech. Ve studii Godwina a spol., zabývající se účinkem cisplatinu na lidské nádorové buňky vaječnicku, byla pozorována silná korelace mezi rezistencí nádorových buněk a hladinou glutathionu⁴¹. Při bližším studiu enzymů, uplatňujících se v metabolismu glutathionu, byla detegována výrazně nižší hladina mRNA pro γ -glutamyl-cysteinsynthetasy a rovněž pro γ -glutamyltranspeptidasu u linií s nižší rezistencí k cisplatině⁴¹.

V souvislosti se syntézou glutathionu si již Welbourne při svém pozorování metabolismu ledvin krys povšiml zajímavé spojitosti mezi glutaminem a glutathionem⁴². Zdálo se, že za podmínek absence glutaminu je syntéza glutathionu snížena až o 40 % a tento efekt byl zvrácen přidávkou glutaminu. Zmíněná hypotéza byla dále potvrzena při sledování inkorporace značeného glutaminu do vznikajících molekul glutathionu. Jak vyplývá z výsledků těchto pozorování, glutamin je limitujícím prvkem pro syntézu glutathionu za podmínek oxidačního stresu⁴².

2.4.2. Regenerace redukované formy nikotinamidadenindinukleotidfosfátu

NADPH, redukovaná forma kofaktoru NADP⁺, se uplatňuje v udržování redoxní rovnováhy v buňce, zejména pak ve zpětné redukcii GSSG na GSH, a rovněž poskytuje redukcí ekvivalenty pro biosyntetické účely. Tato molekula vzniká redukcí NADP⁺, ke které dochází při různých metabolických reakcích, přičemž nejznámější cestou syntézy NADPH je pentosový cyklus. NADPH vzniká rovněž při přeměně malátu na pyruvát, která je katalyzována malátdehydrogenasou (dekarboxylující), a také při přeměně isocitrátu na 2-oxoglutarát za katalýzy NADP⁺-dependentní isocitrátdehydrogenasou. Nicméně až 40 % NADPH vzniká při metabolismu folátů, převážně tetrahydrofolátu (THF). Během těchto metabolických přeměn se CH₂-skupina přenáší ze serinu na THF za vzniku methylen-THF, který je následně oxidován za vzniku formyl-THF a současně redukce NADP⁺ na NADPH (cit.⁴³). Glutamin jakožto zdroj 2-oxoglutarátu se podílí na regeneraci NADPH prostřednictvím syntézy malátu, jak je zobrazeno na obr. 2. Nicméně Son a spol. ve své studii na buněčné linii, pocházející z duktálního adenokarcinomu pankreatu, poukázali na to, že z hlediska regenerace NADPH je glutamin využíván preferenčně jinou cestou⁴⁴. Nejprve je využit na syntézu aspartátu díky aspartáttransaminase, ten je následně přeměňován na oxalacetát, rovněž za katalýzy aspartáttransaminasou, a v dalším kroku je oxalacetát přeměňován malátdehydrogenasou na malát, který je využit pro přeměnu na pyruvát⁴⁴.

Rovněž bylo pozorováno, že glutamin se u nádorových buněk podílí až z 60 % na redukcii nikotinamidadenindinukleotidu (NAD⁺) i ubichinonu, což je přibližně dvakrát více než kolik činí podíl glukosu. Deplece glutaminu má tedy větší vliv na celkový poměr NADH/NAD⁺. Nečekaně byl tento jev pozorován v případě normoxie i hypoxie⁴⁵.

3. Syntéza glutaminu

Není možné opomenout, že přestože některé nádorové buňky jsou zcela odkázány na vnější přísun glutaminu, jiné jsou schopny jej samy syntetizovat⁴⁶. Klíčem k této syntéze je přítomnost cytosolického enzymu, glutaminsynthetasy (GS), katalyzujícího v závislosti na přítomnosti ATP reakci glutamové kyseliny a amoniaku za vzniku glutaminu⁴⁷.

Studie na buňkách gliomu ukázaly, že produkce GS je zvýšena jako odpověď na snížení hladiny glutaminu v médiu⁴⁸, což umožňuje těmto buňkám přežít i za podmínek deplece glutaminu⁴⁹.

Míra produkce GS může mít vliv i na průběh léčby nádorového onemocnění. Jak bylo pozorováno u nádorů vaječníků, pacienti s vyšší produkcí GS vykazovali horší prognózu a naopak ztišení produkce tohoto enzymu snížilo schopnost buněk proliferovat⁵⁰, přičemž podobných závěrů bylo dosaženo i v případě buněk karcinomu prsu⁵¹.

4. Uplatnění glutaminu v terapii nádorových onemocnění

Z předcházejícího výčtu rolí glutaminu je zjevné, že inhibice jeho metabolismu představuje atraktivní cíl protinádorové terapie. Z dobře prozkoumaných alternativ uvedme inhibici SLC1A5 receptoru, enzymů účastnících se glutaminolýzy – GLS, GLUD a AMT a často opomíjené cílení na samotný glutamin prostřednictvím asparaginasy. Tyto inhibitory jsou rovněž zaznamenány na obr. 2.

4.1. Inhibice transportu glutaminu

Ve studii Hassaneina, zabírající se terapií nemalobuněčného nádoru plic, bylo poprvé poukázáno na SLC1A5 přenašeč jako na potenciální terapeutický cíl⁵². Toto zjištění vycházelo z pozorování, že vysoká produkce tohoto přenašeče přímo souvisí se špatnou prognózou onemocnění. Použitím γ -L-glutamyl-*p*-nitroanilidu, selektivního inhibitoru SLC1A5 přenašeče, bylo dosaženo inhibice buněčného růstu a indukce apoptózy *in vitro* způsobené neschopností nádorové buňky uspokojit poptávku po extracelulárním glutaminu a potenciálně dalších neutrálních aminokyselinách. Při bližším studiu mechanismu účinku tohoto inhibitoru bylo zjištěno, že deplece glutaminu vyvolaná inhibicí tohoto přenašeče vede zpočátku k autofagii a po čase přímo k apoptóze a buněčné smrti, která je doprovázena poklesem intracelulární hladiny ATP. Kromě *in vitro* účinku na více tkáňových liniích bylo také pozorováno utlumení růstu nádoru *in vivo*⁵².

4.2. Cílení na glutaminasu

Prvním krokem vedoucím k intracelulárnímu využití glutaminu je jeho hydrolyza katalyzovaná GLS. Tento enzym, a obzvlášť pak jeho v organismu více rozšířená forma GLS1, proto představuje důležitý cíl protinádorové terapie. Historicky první testovaný inhibitor GLS1 byl 6-diazo-5-*oxy*-L-norleucin, ireverzibilní inhibitor soupeřící s glutaminem o aktivní místo enzymu. Nicméně tento inhibitor není selektivní a má řadu dalších cílů, což se ukázalo jako příčina vážných nežádoucích účinků u pacientů v klinických studiích⁵³. V posledním desetiletí byly testovány specifičtější allosterické inhibitory GLS (cit.⁵⁴). Příkladem těchto inhibitorů je bis[2-(5-fenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl]sulfid, známý pod zkratkou BPTES. Tento inhibitor se váže na povrch dimeru GLS1, brání tvorbě tetrameru a tlumí tak katalytickou aktivitu enzymu. Výhodami při použití BPTES jsou jeho aktivita již při submikromolárních koncentracích a zároveň jeho struktura, která je odlišná od glutaminu i glutamátu. Při aplikaci tedy nedochází k interakci inhibitoru s přenašeči, receptory či enzymy jejich metabolických drah⁵⁵. Nevýhodami limitujícími klinické použití BPTES jsou však jeho vysoká molekulová hmotnost, nízká stabilita, špatná rozpustnost a biodostupnost. Druhým allosterickým inhibitorem je CB-839, který prokázal antiproliferační aktivitu při *in vitro*

a *in vivo* testování na několika odlišných liniích odvozených od trojnásobně-negativního nádoru prsu¹⁸ a který je rovněž testován v klinických studiích u pacientů s krevními malignitami a různými solidními tumory⁵⁶. Třetím příkladem allosterického inhibitoru GLS je molekula označená jako 968, která prokázala *in vitro* antiproliferační aktivitu na mozkové, pankreatické a prsní nádorové linii rezistentní k běžné chemoterapii^{54,57,58}.

4.3. Cílení na glutamátdehydrogenasu a aminotransferasy

Jin a spol. ve své práci, studující mechanismus vlivu glutaminolýzy na udržení redoxní rovnováhy v nádorové buňce, označili za kritický prvek tohoto děje GLUD (cit.⁵⁹). Dle jejich výsledků se GLUD1 nepřímo podílí na udržování redoxní rovnováhy syntézou 2-oxoglutarátu, jenž je v rámci citrátového cyklu přeměňován na fumarát, který je schopen aktivace glutathionperoxidasy. Takto aktivovaná peroxidasa se poté podílí na antioxidační ochraně buňky a neutralizaci ROS. Utlumením produkce GLUD1 bylo dosaženo snížení proliferace nádorových buněk *in vitro* a pomalejšího růstu nádoru. Mimo jiné takto suprimovaná produkce GLUD1, a s tím související snížená míra glutaminolýzy, iniciovala vyšší závislost buněk na glykolýze a tedy i vyšší citlivost ke stresovým podmínkám. Cílení na GLUD1 je tedy oprávněně považováno za možný terapeutický cíl v léčbě některých nádorových onemocnění. Známým inhibitorem GLUD je epigallokatechin galát, polyfenolická látka bohatě obsažená v zeleném čaji^{59,60}, jejíž účinnost je již testována v řadě klinických studií zabývajících se jejím vlivem na solidní tumory⁵⁶.

Lákavým cílem pro terapii nádorových onemocnění jsou rovněž AMT, jejichž aktivita také souvisí s proliferační schopností nádorových buněk. Příkladem takové terapie je použití aminooxyoctové kyseliny, která je nespecifickým inhibitorem AMT a při její aplikaci za podmínek *in vitro* bylo pozorováno snížení proliferace nádorových buněk, vyvolané pravděpodobně navozením stresu endoplasmatického retikula^{61,62}.

4.4. Asparaginasa

Asparaginasa (ASN) je enzym již více než 40 let používaný jako lék proti akutní lymfoblastické leukemii a non-Hodgkinovým lymfomům. Mechanismus působení ASN spočívá v hydrolyze extracelulárního L-asparaginu za vzniku L-asparagové kyseliny. Méně intenzivní glutaminasová aktivita enzymu, jež představuje běžně 3–4 % celkové aktivity⁶³, způsobuje hydrolyzu extracelulárního L-glutaminu za vzniku L-glutamové kyseliny⁶⁴. Díky schopnosti ASN štěpit glutamin je vhodné ji také uvést jako možné terapeutikum cílené na metabolismus glutaminu⁶⁵. Působením asparaginasy jsou glutamin a asparagin rychle odstraňovány z krve, což způsobí, že nádorové buňky závislé na exogenním příjmu těchto aminokyselin hladově a dochází k jejich smrti⁶⁶.

5. Závěr

Nádorová onemocnění představují druhou nejčastější příčinu úmrtí na světě a i přes vysokou heterogenitu nádorů byly nalezeny některé společné znaky, které jsou pro ně charakteristické. Jedním z nich se v posledních letech stal i metabolismus nádorových buněk. Z publikovaných studií je zřejmé, že cílení na metabolismus nádorových buněk může zefektivnit stávající terapii, a tím zlepšit prognózu nádorových onemocnění a s tím související výskyt recidivy. Cílení na tak hojný a rozšířený substrát, jako je glutamin, jehož role v nádorové tkáni je podstatně významnější v porovnání s tkání nenádorovou, je pak o to lákavější a má vysoké šance na úspěch. Přestože se většina publikovaných studií z této oblasti opírá o výsledky *in vitro* experimentů, stále více výzkumů postupuje do fáze *in vivo* testování či klinických studií. I z jejich výsledků je zřejmé, jak významný potenciál v sobě cílení na metabolismus glutaminu skrývá. Pro hlubší porozumění této problematice, obzvláště pak role glutaminu v nádoru jako takovém a ne pouze jednotlivých nádorových buňkách, je třeba další výzkum, především z oblasti klinické praxe.

Seznam zkratk

AMT	aminotferasa
ASN	asparaginasa
BPTES	bis[2-(5-fenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl]sulfid
GLS	glutaminasa
GLUD	glutamátdehydrogenasa
GS	glutaminsynthetasa
GSH	redukována forma glutathionu
GSSG	oxidovaná forma glutathionu
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORc1	mTOR komplex 1
NAD ⁺	nikotinamidadeninukleotid
NADH	redukována forma NAD ⁺
NADP ⁺	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NADPH	redukována forma NADP ⁺
ROS	reaktivní kyslíkové sloučeniny
SLC	solute carrier
Tet2	ten-eleven translocation
THF	tetrahydrofolát

Práce vznikla v rámci projektů OPPK CZ.2.16/3.1.00/24503, OPPK CZ.2.16/3.1.00/21537 za podpory projektu NPU I LO1601. Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT č. 21-SVV/2019.

LITERATURA

- Martinez-Outschoorn U. E., Peiris-Pagés M., Pestell R. G., Sotgia F., Lisanti M. P.: *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14**, 11 (2016).
- Hensley C. T., Wasti A. T., DeBerardinis R. J.: *J. Clin. Invest.* **123**, 3678 (2013).
- Bhutia Y. D., Ganapathy V.: *Biochim. Biophys. Acta* **1863**, 2531 (2016).
- Altman B. J., Stine Z. E., Dang C. V.: *Nat. Rev. Cancer* **16**, 619 (2016).
- Xu X. D., Shao S. X., Jiang H. P., Cao Y. W., Wang Y. H., Yang X. C., Wang Y. L., Wang X. S., Niu H. T.: *Oncol. Res. Treat.* **38**, 117 (2015).
- Estrela J. M., Ortega A., Obrador E.: *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **43**, 143 (2006).
- Eagle H.: *Science* **122**, 501 (1955).
- Bhutia Y. D., Babu E., Ramachandran S., Ganapathy V.: *Cancer Res.* **75**, 1782 (2015).
- Scalise M., Pochini L., Galluccio M., Indiveri C.: *Biochim. Biophys. Acta* **1857**, 1147 (2016).
- Scalise M., Pochini L., Galluccio M., Console L., Indiveri C.: *Front. Oncol.* **7**, 306 (2017).
- DeBerardinis R. J., Cheng T.: *Oncogene* **29**, 313 (2010).
- Gaglio D., Soldati C., Vanoni M., Alberghina L., Chiaradonna F.: *PLoS One* **4**, e4715 (2009).
- Alberghina L., Gaglio D.: *Cell Death Dis.* **5**, e1561 (2014).
- Wise D. R., Thompson C. B.: *Trends Biochem. Sci.* **35**, 427 (2010).
- Warburg O., Wind F., Negelein E.: *J. Gen. Physiol.* **8**, 519 (1927).
- Zhdanov A. V., Waters A. H. C., Golubeva A. V., Dmitriev R. I., Papkovsky D. B.: *Biochim. Biophys. Acta* **1837**, 51 (2014).
- Zelenka J., Koncošová M., Ruml T.: *Biotechnol. Adv.* **36**, 583 (2018).
- Gross M. I. a 19 spoluautorů: *Mol. Cancer Ther.* **13**, 890 (2014).
- Kovacević Z.: *Biochem. J.* **125**, 757 (1971).
- Mullen A. R., Wheaton W. W., Jin E. S., Chen P. H., Sullivan L. B., Cheng T., Yang Y., Linehan W. M., Chandel N. S., DeBerardinis R. J.: *Nature* **481**, 385 (2011).
- Wise D. R., Ward P. S., Shay J. E. S., Cross J. R., Gruber J. J., Sachdeva U. M., Platt J. M., DeMatteo R. G., Simon M. C., Thompson C. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 19611 (2011).
- Holleran A. L., Briscoe D. A., Fiskum G., Kelleher J. K.: *Mol. Cell. Biochem.* **152**, 95 (1995).
- Ookhtens M., Kannan R., Lyon I., Baker N.: *Am. J. Physiol.* **247**, R146 (1984).
- Dang L. a 19 spoluautorů: *Nature* **462**, 739 (2009).
- Raineri S., Mellor J.: *Front. Genet.* **9**, 493 (2018).
- Wullschleger S., Loewith R., Hall M. N.: *Cell* **124**, 471 (2006).
- Laplanche M., Sabatini D. M.: *Cell* **149**, 274 (2012).
- Liu Y., Xu H., An M.: *Sci. Rep.* **7**, 7339 (2017).
- Wang L., Rhodes C. J., Lawrence J. C.: *J. Biol. Chem.* **281**, 24293 (2006).
- Martinet W., De Loof H., De Meyer G. R. Y.: *Atherosclerosis* **233**, 601 (2014).
- Mizushima N., Levine B., Cuervo A. M., Klionsky D. J.: *Nature* **451**, 1069 (2008).
- Jewell J. L., Russell R. C., Guan K.: *Nat. Rev. Mol.*

- Cell Biol. 14, 133 (2013).
33. Burnett P. E., Barrow R. K., Cohen N. A., Snyder S. H., Sabatini D. M.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 1432 (1998).
 34. Fuchs B. C., Bode B. P.: Semin. Cancer Biol. 15, 254 (2005).
 35. Nicklin P. a 16 spoluautorů: Cell 136, 521 (2009).
 36. Storz P.: Front. Biosci. 10, 1881 (2005).
 37. Meister A: Methods Enzymol. 251, 3 (1995).
 38. Fang Y., Yang S., Lupton J. R., Turner N. D., Wu G.: J. Nutr. 134, 489 (2004).
 39. Griffith O. W.: Free Radical Biol. Med. 27, 922 (1999).
 40. Bannai S.: J. Biol. Chem. 261, 2256 (1986).
 41. Godwin A. K., Meister A., O'Dwyer P. J., Huang C. S., Hamilton T. C., Anderson M. E.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89, 3070 (1992).
 42. Welbourne T. C.: Can. J. Biochem. 57, 233 (1979).
 43. Fan J., Ye J., Kamphorst J. J., Shlomi T., Thompson C. B., Rabinowitz J. D.: Nature 510, 298 (2014).
 44. Son J. a 17 spoluautorů: Nature 496, 101 (2013).
 45. Fan J., Kamphorst J. J., Mathew R., Chung M. K., White E., Shlomi T., Rabinowitz J. D.: Mol. Syst. Biol. 9, 712 (2013).
 46. Castegna A., Menga A.: Genes 9, E108 (2018).
 47. Listrom C. D., Morizono H., Rajagopal B. S., McCann M. T., Tuchman M., Allewell N. M.: Biochem. J. 328, 159 (1997).
 48. He Q., Shi X., Zhang L., Yi C., Zhang X., Zhang X.: Mol. Imaging 15 (2016).
doi: 10.1177/1536012116645440.
 49. Tardito S. a 19 spoluautorů: Nat. Cell Biol. 17, 1556 (2015).
 50. Fan S. a 11 spoluautorů: J. Cell. Biochem. 119, 6008 (2018).
 51. Wang Y., Fan S., Lu J., Zhang Z., Wu D., Wu Z., Zheng Y.: J. Cell. Biochem. 118, 2018 (2017).
 52. Hassanein M. a 11 spoluautorů: Int. J. Cancer 137, 1587 (2015).
 53. Pinkus L. M.: Methods Enzymol. 46, 414 (1977).
 54. Katt W. P., Cerione R. A.: Drug Discovery Today 19, 450 (2014).
 55. Robinson M. M., McBryant S. J., Tsukamoto T., Rojas C., Ferraris D. V., Hamilton S. K., Hansen J. C., Curthoys N. P.: Biochem. J. 406, 407 (2007).
 56. <https://clinicaltrials.gov>, staženo 5. 4. 2019.
 57. Simpson N. E., Tryndyak V. P., Beland F. A., Pogribny I. P.: Breast Cancer Res. Treat. 133, 959 (2012).
 58. Katt W. P., Antonyak M. A., Cerione R. A.: Mol. Pharmaceutics 12, 46 (2015).
 59. Jin L. a 20 spoluautorů: Cancer Cell 27, 257 (2015).
 60. Li C., Allen A., Kwagh J., Doliba N. M., Qin W., Najafi H., Collins H. W., Matschinsky F. M., Stanley C. A., Smith T. J.: J. Biol. Chem. 281, 10214 (2006).
 61. Thornburg J. M., Nelson K. K., Clem B. F., Lane A. N., Arumugam S., Simmons A., Eaton J. W., Telang S., Chesney J.: Breast Cancer Res. 10, R84 (2008).
 62. Korangath P. a 14 spoluautorů: Clin. Cancer Res. 21, 3263 (2015).
 63. Miller H. K., Salser J. S., Balis M. E.: Cancer Res. 29, 183 (1969).
 64. Lanvers-Kaminsky C.: Cancer Chemother. Pharmacol. 79, 439 (2017).
 65. Chen L., Cui H.: Int. J. Mol. Sci. 16, 22830 (2015).
 66. Lazarus H., McCoy T. A., Farber S., Barell E. F., Foley G. E.: Exp. Cell Res. 57, 134 (1969).
- N. Vrzáčková, T. Ruml, and J. Zelenka**
(Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology Prague, Prague): **Glutamine Metabolism and Its Role in the Therapy of Cancer**
- Inhibition of selected metabolic pathways is a hot topic in current cancer therapy. This is caused by the fact that metabolic transformation across different types of cancer cells is highly similar and, on the other hand, significantly different from the non-cancer cells. In this regard, glutamine is especially interesting because it serves not only as a donor of carbon skeletons and amino groups for the cell anabolism but also as a substrate involved in the energetic metabolism, redox homeostasis, and antioxidant protection. Therapeutic aiming at the glutamine metabolism offers a significant opportunity to improve the prognosis of cancer patients.
- Keywords: glutamine, cancer therapy, metabolism