

Received: 2015.12.03
Accepted: 2016.06.22
Published: 2016.09.13

Znaczenie fosfofruktokinazy II (PFK-2)/fruktozo-2,6-bisfosfatazy (FBPazy-2) w przeprogramowaniu metabolicznym komórek nowotworowych*

The role of 6-phosphofructo-2-kinase (PFK-2)/fructose 2,6-bisphosphatase (FBPase-2) in metabolic reprogramming of cancer cells

Kinga A. Kocemba, Joanna Dulińska-Litewka, Przemysław A. Pękała, Karolina L. Wojdyła

Katedra Biochemii Lekarskiej, Uniwersytet Jagielloński-Collegium Medicum, Kraków

Streszczenie

Utrzymanie dużej aktywności glikolitycznej w komórkach nowotworowych jest konieczne do zapewnienia odpowiedniego poziomu energii oraz składników budulcowych dla intensywnie proliferujących komórek. Na uwagę zasługuje to, że komórki nowotworowe nawet w obecności tlenu metabolizują glukozę głównie w procesie fermentacji mleczanowej, do minimum ograniczając fosforylację oksydacyjną. Zjawisko to, określane efektem Warburga, uważane jest za jedną z najbardziej fundamentalnych zmian metabolicznych w nowotworach. U podłoża efektu Warburga leży nasiloną aktywność glikolityczna komórki będąca konsekwencją aktywacji proto-onkogenów, utraty funkcji genów supresorowych oraz hipoksji, która bardzo często towarzyszy kancerogenezie. Enzymem glikolitycznym indukowanym w procesie kancerogenezy jest m.in. dwufunkcyjny enzym z rodziny kinaz fosforylujących fruktozo-6-fosforan, tj. fosfofruktokinaza II (PFK-2)/fruktozo-2,6-bisfosfataza (FBPaza-2). Aktywność kinazowa PFK-2 przyczynia się do wzrostu stężenia fruktozo-2,6-bisfosforanu, będącego silnym aktywatorem allosterycznym fosfofruktokinazy I, enzymu katalizującego reakcję stanowiącą główny punkt kontrolny szybkości glikolizy. W dotychczasowych badaniach wykazano silną korelację między aktywnością fosfofruktokinazy II a agresywnością nowotworów, co jednoznacznie wskazuje na podstawowe znaczenie tego enzymu w procesie kancerogenezy. W pracy przedstawiono stan wiedzy na temat wpływu wysokiej ekspresji fosfofruktokinazy II na metabolizm oraz progresję różnego typu nowotworów.

Słowa kluczowe:

PFKFB3 • PFKFB4 • fosfofruktokinaza II • glikoliza • efekt Warburga • metabolizm nowotworów • hipoksja

Summary

The high rate of glucose breakdown is the fingerprint of cancer. Increased glycolysis allows tumour cells to fulfil their high energetic and biosynthetic demands. Interestingly, however, rather than metabolizing glucose in the oxidative phosphorylation pathway, cancer cells generally use glucose for aerobic glycolysis. This phenomenon is known as the Warburg effect and is considered as one of the most fundamental forms of metabolic reprogramming during cancerogenesis. Changes in the rate of glycolytic activity of cancer cells are caused

*Publikacja pracy została sfinansowana z funduszy Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW).

mainly by the increased expression of glycolytic enzymes as a consequence of activation of oncogenes or loss of tumour suppressors. In addition, the hypoxic tumour environment also triggers upregulation of a series of genes involved in glucose metabolism. Among the metabolic enzymes that are modulated by these factors in cancer cells are the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatases (PFKFBs), a family of bifunctional enzymes that control the levels of fructose 2,6-bisphosphate (Fru-2,6-P₂), an essential activator of the glycolytic flux. Fru-2,6-P₂ strongly activates glucose breakdown in glycolysis through allosteric modulation of the rate-limiting enzyme of glycolysis, phosphofruktokinase-1 (PFK-1). Thus far, many studies have reported a correlation between aberrant PFKFB expression level and the grade of tumour aggressiveness, which directly indicates that these enzymes may play a crucial role in cancerogenesis. The objective of this review is to highlight the recent studies on aberrant expression of PFKFBs and its influence on cancer progression.

Key words: *PFKFB3 • PFKFB4 • PFK-2 • glycolysis • Warburg effect • cancer metabolism • hypoxia*

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?CID=1218187>

Word count: 4613
Tables: –
Figures: 2
References: 103

Adres autorki: dr Kinga Kocemba, Katedra Biochemii Lekarskiej, ul. Kopernika 7, 31-034 Kraków;
 e-mail: kinga.kocemba@uj.edu.pl

Wykaz skrótów: **AMPK** – kinaza aktywowana 5'adenozynomonofosforanem (5' AMP-activated protein kinase); **APC** – kompleks promujący anafazę (anaphase-promoting complex); **APC/CDH1** – kompleks promujący anafazę zależny od kadheryny-1 (cadherin-1-dependent anaphase-promoting complex); **c-MYC** – protoonkogen Myc; **Cdc25C** – (M-phase inducer phosphatase 3); **Cdk1** – cyklinozależna kinaza 1 (cyclin-dependent kinase 1); **F-2,6-P₂** – fruktozo-2,6-bisfosforan; **FBPaza-2** – fruktozo-2,6-bisfosfataza II; **GLUT** – transporter glukozy; **GSH** – zredukowany glutation; **H-ras** – homolog onkogeny Harvey rat sarcoma (Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog); **HepG2** – linia komórkowa ludzkiego raka wątroby HepG2 (human liver carcinoma cell line HepG2); **HIF-1** – czynnik indukowany hipoksją (hypoxia-inducible factor 1); **HK** – heksokinaza (hexokinase); **HK-2** – heksokinaza II (hexokinase-2); **HO-1** – oksygenaza hemowa-1 (heme oxygenase 1); **HO-2** – oksygenaza hemowa-2 (heme oxygenase 2); **HRE** – element odpowiedzi na hipoksję (HIF-responsive element); **LDH** – dehydrogenaza mleczanowa (lactate dehydrogenase); **LKB1** – wątrobowa kinaza B1 (liver kinase B1); **MAP/MAPK** – kinazy aktywowane mitogenami (mitogen-activated protein kinases); **miRNA-23b** – mikroRNA-23b (micro RNA-23b); **MTG16** – gen transformujący komórki szpiku kostnego leżący na chromosomie 16 (myeloid transforming gene on chromosome 16); **mTOR** – ssaczy cel rapamycyny (mammalian target of rapamycin); **NADPH** – zredukowany fosforan dwunukleotydu nikotynoamidoadeninowego; **p27** – cyklinozależny inhibitor kinazy 1B (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B); **PDH** – dehydrogenaza pirogronianowa (pyruvate dehydrogenase); **PDK1** – kinaza dehydrogenazy pirogronianowej 1 (pyruvate dehydrogenase kinase); **PFK-1** – fosfofruktokinaza I (phosphofruktokinase-1); **PFK-2** – fosfofruktokinaza II (phosphofruktokinase-2); **PFKFB1** – 6-fosfofrukto-2-kinaza/fruktozo-2,6-bisfosfataza I (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 1); **PFKFB2** – 6-fosfofrukto-2-kinaza/fruktozo-2,6-bisfosfataza II (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 2); **PFKFB3** – 6-fosfofrukto-2-kinaza/fruktozo-2,6-bisfosfataza III (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3); **PFKFB4** – 6-fosfofrukto-2-kinaza/fruktozo-2,6-bisfosfataza IV (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4); **PK** – kinaza pirogronianowa (pyruvate kinase); **PTEN** – analog fosfatazy i tensyny (phosphatase and tensin homolog); **Rb** – białko retinoblastomy (retinoblastoma protein); **RFT** – reaktywne formy tlenu; **SAH** – S-adenozylhomocystyna; **SCO2** – zespół oksydazy cytochromu c (synthesis of cytochrom c oxidase 2); **Ser466** – seryna 466; **Ser483** – seryna 483; **TGF-β** – transformujący czynnik wzrostu beta (transforming growth factor beta); **TIGAR** – regulator glikolizy i apoptozy indukowany przez białko p53 (p53-induced glycolysis and apoptotic regulator) **TP53** – gen kodujący białko p53; **VHL** – białko von-Hippel-Lindau (von-Hippel-Lindau protein); **WNT** – protoonkogen WNT (WNT proto-oncogene protein).

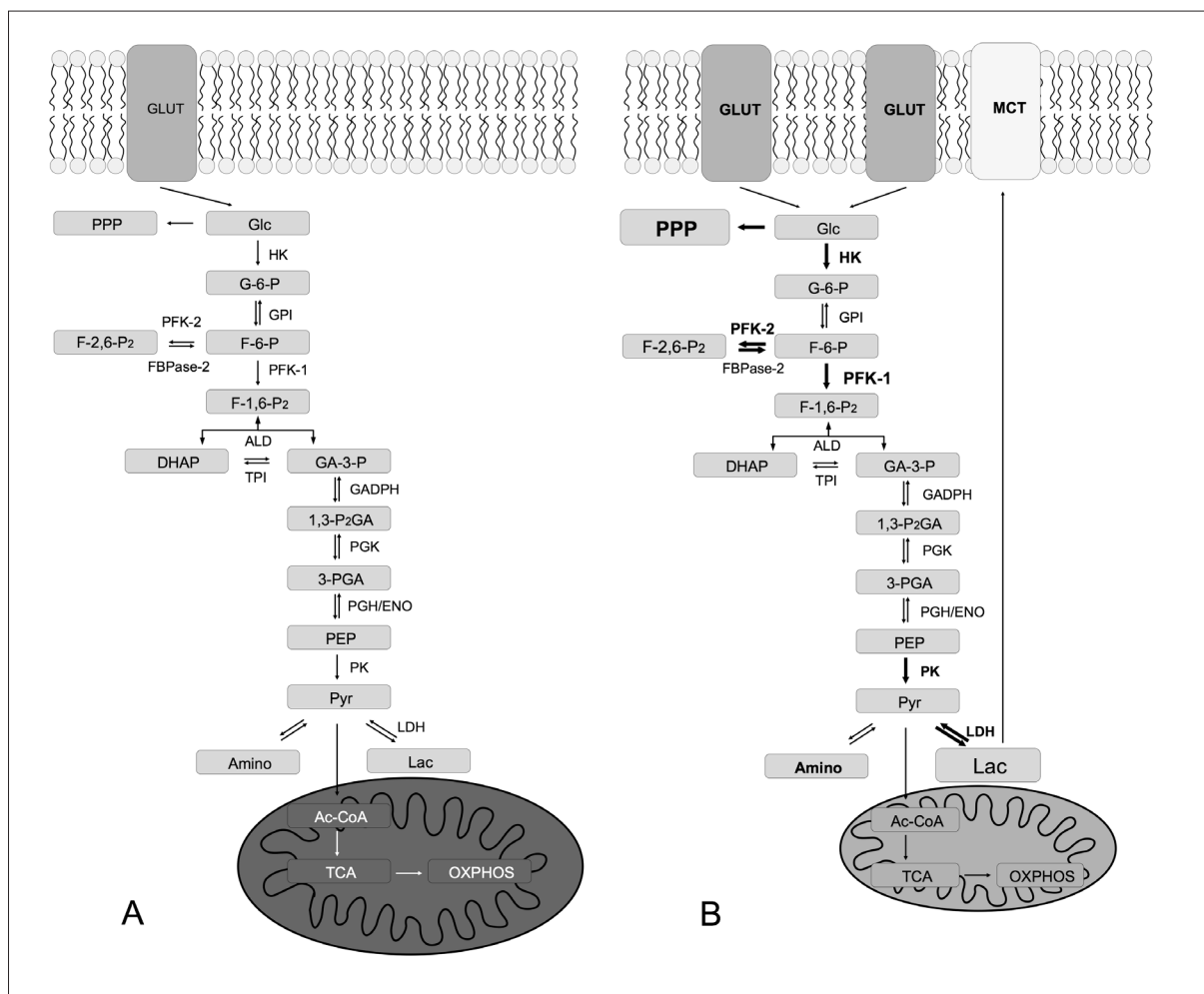
RYS HISTORYCZNY

W latach dwudziestych XX w. niemiecki biochemik Otto Warburg przeprowadził eksperyment, którego wyniki jednoznacznie wykazały, że komórki nowotworowe w warunkach tlenowych preferencyjnie wprowadzają glukozę na szlak glikolizy, przy niewielkiej aktywności reakcji łańcucha oddechowego. Podstawą badań było oznaczenie oraz porównanie zawartości glukozy i mleczanu w żyłach i tętnicach unaczyniających szczerze guzy nowotworowe [91]. Preferencyjne prowadzenie oddychania beztlenowego przez komórki nowotworowe, nawet w obecności dostatecznie dużych ilości tlenu, zaczęto określać od tego czasu efektem Warburga. Otto Warburg twierdził również, że osłabiony układ immunologiczny oraz zmieniony metabolizm są główną przyczyną pojawiania się nowotworów w organizmie ludzkim. Wieloletnie prace doprowadziły do sformułowania w 1956 r. przez Warburga hipotezy mówiącej o tym, że u podstaw procesu nowotworzenia leżą przede wszystkim nieodwracalne uszkodzenia enzymów odpowiedzialnych za oksydacyjny metabolizm komórek. Według tej teorii inicjacja kancerogenezy miała polegać głównie na utracie przez komórkę zdolności do przeprowadzania fosforylacji oksydacyjnej [92]. Późniejsze badania wykazały jednak, że uzasadnienie wzrostu aktywności metabolizmu beztlenowego w warunkach tlenowych sformułowane przez Warburga nie jest zgodne z faktycznym stanem rzeczy. Okazało się bowiem, że dużo ważniejszą rolę w metabolicznych zmianach opisanych przez Warburga odgrywa zwiększenie aktywności enzymów glikolitycznych niż proponowane upośledzenie fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach, która w wielu nowotworach przebiega niezakłócona oprócz wzmoczonej fermentacji mleczanowej [55]. Obecnie główną rolę w przeprogramowaniu metabolicznym komórek nowotworowych łączy się z dysfunkcją genów supresorowych oraz ze wzrostem aktywności onkogenów [42]. Ostatnie lata przyniosły nowe odkrycia dotyczące biologii nowotworów (m.in. potwierdzono występowanie w pewnych nowotworach równoległe dwóch subpopulacji komórek – jednej o metabolizmie opisywanym przez Warburga, wytwarzającej duże ilości mleczanu oraz drugiej, metabolizującej wytworzony mleczan [34]), co spowodowało, że efekt Warburga ponownie stał się ważnym zagadnieniem związanym z metabolizmem komórek nowotworowych. Niewątpliwie lepsze poznanie metabolizmu nowotworów może się okazać ważne w zrozumieniu regulacji ich podziałów, a to umożliwiłoby opracowanie strategii walki z rakiem, będącym główną przyczyną zgonów w krajach wysoko rozwiniętych. Wyniki badań wskazują, że poza szybszym, lecz mniej wydajnym wytwarzaniem ATP metabolizm beztlenowy glukozy zwiększa aktywność szlaków, które pozwalają wytwarzać substraty konieczne do intensywnej proliferacji komórek nowotworowych [86]. Warto nadmienić, że efekt Warburga nie jest jedyną, a więc nie jest uniwersalną cechą wszystkich nowotworów, gdyż opisano wiele nowotworów, których metabolizm zasadniczo odbiega od modelu zakładającego przewagę

metabolizmu beztlenowego [15,103]. Należy jednak podkreślić, że najnowsze doniesienia wskazują na ochronne działanie małego stężenia glukozy na komórki prawidłowe oraz toksycznego na komórki nowotworowe [67], co jednoznacznie sugeruje, że modulowanie metabolizmu glukozy w nowotworach może być bardzo obiecującym celem nowych terapii.

ZNACZENIE EFEKTU WARBURGA DLA KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Prawidłowe komórki ludzkie podlegające podziałom komórkowym jako główne źródło energii wykorzystują fosforylację oksydacyjną. Jedna cząsteczka glukozy może się stać wtedy źródłem aż 32 cząsteczek ATP [63], natomiast w przypadku metabolizmu opartego wyłącznie na glikolizie zysk wynosi zaledwie 2 cząsteczki ATP na jedną cząsteczkę glukozy. Mimo iż tlenowy metabolizm glukozy jest bardziej wydajny, to metabolizm oparty na intensywnie zachodzącej glikolizie dostarcza metabolitów pośrednich, niezbędnych do syntezy kwasów nukleinowych, białek oraz lipidów, na które istnieje ciągle duże zapotrzebowanie w związku z intensywnie zachodzącymi podziałami komórkowymi. Przemianom glukozy w szlaku pentozofosforanowym towarzyszy wytwarzanie zredukowanego fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH), niezbędnego nie tylko do biosyntezy redukcyjnych, ale także do utrzymania optymalnego stężenia zredukowanego glutationu (GSH), który pełni główną rolę w ochronie komórki przed reaktywnymi formami tlenu (RFT) [12]. Warto nadmienić, że mimo iż tylko około 10% komórkowego zredukowanego glutationu (GSH) znajduje się w mitochondrium, to jest ważny w ochronie organelli komórkowych przed działaniem RFT powstających w przebiegu fosforylacji oksydacyjnej [28]. Stężenie RFT w komórkach nowotworowych jest zazwyczaj duże, a to sprzyja uszkodzeniom DNA i progresji nowotworu, wpływając toksycznie na wszystkie struktury komórkowe oraz działając proapoptotycznie [87], co sprawia, że konieczne jest utrzymanie RFT w komórce nowotworowej na stałym poziomie [46]. Ponadto reaktywne formy tlenu mogą indukować apoptozę w komórkach pozbawionych glukozy, gdyż i ich duże stężenie hamuje utlenianie kwasów tłuszczowych, będących alternatywnym źródłem energii w razie braku cukru [73]. Innym ważnym dla progresji nowotworu czynnikiem metabolicznym jest zakwaszenie, w wyniku nadmiernego wytwarzania mleczanu, końcowego produktu glikolizy beztlenowej. Mleczan jest wydzielany do przestrzeni pozakomórkowej, powodując rozwój lokalnej kwasicy. Niskie pH w mikrośrodkowisku guza powoduje śmierć okolicznych prawidłowych komórek, degradację macierzy międzykomórkowej oraz indukcję angiogenezy, co wywołuje wzrost agresywności nowotworu [27]. Oznaczenie stężenia dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w surowicy jest powszechnie znanym markerem prognostycznym stosowanym w wielu nowotworach, m.in. raka nosogardła, czerniaka, raka stercza, raka szyjki macicy, jelita grubego, płuc oraz głowy i szyi [48,89,90,101]. Przebieg metabolizmu glukozy w komórce prawidłowej oraz nowotworowej przedstawiono na ryc. 1.



Ryc. 1. Porównanie przebiegu glikolizy w komórkach prawidłowych (A) i nowotworowych (B); A - Glukoza dostaje się do komórek za pomocą swoistych komórkowych transporterów glukozy określanych jako GLUT. Prawidłowe komórki początkowo metabolizują glukozę do dwóch cząsteczek pirogronianu, który w obecności tlenu przechodzi do mitochondrium, gdzie jest utleniany do acetylo-CoA i następnie włączany w cykl Krebsa. Alternatywną przemianą glukozy jest cykl pentozofosforanowy, którego główną funkcją jest wytwarzanie NADPH niezbędnego do biosyntezy redukcyjnych i do ochrony komórki przed reaktywnymi formami tlenu oraz dostarczanie cząsteczek rybozy do biosyntezy nukleotydów. B - W komórkach nowotworowych obserwuje się zwiększoną ekspresję transporterów glukozy oraz preferencyjne prowadzenie oddychania beztlenowego, nawet przy optymalnej dostępności tlenu. Obserwuje się także wzrost aktywności części enzymów glikolitycznych oraz fosfofruktokinazy 2 (pogrubiona czcionka) oraz podwyższoną aktywność cyklu pentozofosforanowego (pogrubiona strzałka wskazująca alternatywną drogę przemiany glukozy). Gromadzący się w komórkach nowotworowych mleczan, będący końcowym produktem glikolizy beztlenowej, jest wypompowywany na zewnątrz komórki za pomocą transporterów MCT, których ekspresja na komórkach nowotworowych ulega zwiększeniu 1,3-P2GA – 1,3-bisfosfoglicerynian; 3-PGA – 3-fosfoglicerynian; Ac-CoA – acetylo-koenzym A; ALD – aldolaza; Amino – aminokwasy; DHAP – fosfodihydroksyaceton; F-1,6-P2 – fruktozo-1,6-bisfosforan; F-2,6-P2 – fruktozo-2,6-bisfosforan; F-6-P – fruktozo-6-fosforan; G-6-P – glukozo-6-fosforan; GA-3-P – aldehyd 3-fosfoglicerynowy; GADPH – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego; Glc – glukoza; GLUT – transporter glukozy; GPI – izomeraza glukozofosforanowa; HK – heksokinaza; Lac – kwas mlekowy; LDH – dehydrogenaza mleczanowa; MCT – transporter kwasu mlekowego; OXPHOS – fosforylacja oksydacyjna; PEP – fosfoenolpirogronian; PFK-1 – fosfofruktokinaza 1; PFK-2 – fosfofruktokinaza 2; FBPase-2 – fruktozo-2,6-bisfosfataza 2; PGH/ENO – fosfogliceromutaza/enolaza; PGK – kinaza fosfoglicerynianowa; PK – kinaza pirogronianowa; PPP – cykl pentozofosforanowy; Pyr – pirogronian; TCA – cykl Krebsa; TPI – izomeraza triozofosforanowa

MECHANIZM PRZEPROGRAMOWANIA METABOLICZNEGO – EFEKT WARBURGA

Trwałe przełączenie metabolizmu komórki z fosforylacji oksydacyjnej na metabolizm oparty wyłącznie na glikolizie jest możliwe dzięki zwiększonej transkrypcji genów kodujących białka zaangażowane w szlak przemian glukozy, tj. błonowych transporterów glu-

kozy oraz enzymów glikolitycznych. Głównym regulatorem tych zmian jest czynnik transkrypcyjny HIF-1 i w mniejszym stopniu c-Myc. Białko HIF-1 jest heterodimerem zbudowanym z ulegającej konstytutywnej ekspresji podjednostki beta oraz stabilizowanej w środowisku niskotlenowym podjednostki alfa. W warunkach tlenowych reszty proliny w pozycji 402 i 564 podjednostki alfa ulegają hydroksylacji, a modyfikacja umoż-

liwia przyłączenie się białka von Hippa-Lindaua (VHL), będącego E3 ligazą ubikwityny. Wyznakowana ubikwityną podjednostka alfa ulega proteasomalnej degradacji. W przypadku braku tlenu zahamowanie procesu hydroksylacji prowadzi do stabilizacji podjednostki alfa. To powoduje nagromadzenie czynnika transkrypcyjnego HIF-1, który ulega jądrowej translokacji i łączy się z fragmentami HRE (hypoxia response element), znajdującym się w promotorach jego genów targetowych, indukując ekspresję białek zaangażowanych m.in. w procesy glikolizy i angiogenezy [55,74]. Nowotwory, w których zaburzona jest regulacja podjednostki alfa, charakteryzują się kumulacją czynnika transkrypcyjnego HIF-1, mimo optymalnego stężenia parcjalnego tlenu, co wzmacnia ich agresywność [102]. W związku z tym, że kontroli przez HIF-1 podlegają transportery glukozy, wszystkie enzymy glikolizy i enzymy odpowiedzialne za dalsze losy powstającego w procesie glikolizy pirogronianu [75], zaburzenia regulacji białka HIF-1 mogą bezpośrednio przyczyniać się do indukcji efektu Warburga w komórkach nowotworowych. Innym istotnym białkiem regulującym procesy nowotworowe jest białko c-Myc będące produktem jednego z najczęściej deregulowanych onkogenów w ludzkich nowotworach. Białko c-Myc aktywuje transkrypcję genów zaangażowanych w procesy wzrostu, apoptozy, transformacji, metabolizmu glukozy, angiogenezy oraz immortalizacji. W przeciwieństwie do komórek prawidłowych, gdzie protoonkogen MYC ulega ścisłej regulacji przez nadrzędne ścieżki sygnałowe, takie jak WNT, Hedgehog, Notch, TGF- β , oraz w odpowiedzi na aktywację wielu receptorowych kinaz tyrozynowych, w komórkach nowotworowych wysoka ekspresja c-Myc jest zwykle wynikiem aberracji chromosomalnej obejmującej translokację i/lub amplifikację genu MYC [17]. Podobnie jak HIF-1, c-Myc indukuje efekt Warburga przez bezpośredni wpływ na ekspresję transporterów glukozy (GLUT), heksokinazy (HK), fosfofruktokinazy I i II (PFK-1 i PFK-2), kinazy pirogronianowej (PK), dehydrogenazy mleczanowej (LDH) oraz enolazy [40,62,77,78]. Możliwa jest także interakcja między HIF-1 i c-Myc zwiększająca transkrypcję heksokinazy II (HK2) i kinazy dehydrogenazy pirogronianowej 1 (PDK1) [41]. Jednak nie tylko zwiększona ekspresja enzymów, ale także pojawienie się izoform niewystępujących w macierzystej tkance może nasilać glikolizę w komórkach nowotworowych [55]. c-Myc bierze udział również w stymulowaniu katabolizmu glutaminy przez represję microRNAs, miR-23a i miR-23b, co wskazuje na dodatkowy poziom złożoności metabolizmu nowotworu [16]. W indukcji efektu Warburga istotną rolę odgrywają także szlaki sygnalizacyjne kinaz tyrozynowych, onkogeny i geny supresorowe [86N.Y.]. Na przykład białko p53 reguluje metabolizm glukozy na kilku etapach, m.in. hamując ekspresję transporterów glukozy GLUT 1, 3 i 4 oraz aktywność fosfofruktokinazy I (PFK-1). Produkt genu *TIGAR* (*TP53* induced glycolysis and apoptosis regulator), kontrolowanego przez p53, zmniejsza aktywność PFK-1 przez zmniejszenie dostępności jej allosterycznego aktywatora fruktozo-2,6-bisfosforanu (F-2,6-P₂). Białko p53 kontroluje nasilenie glikolizy także pośrednio przez zwiększenie ekspresji *PTEN*, będącego

negatywnym regulatorem szlaku PI3K/Akt. Ważnym mechanizmem jest też nasilenie fosforylacji oksydacyjnej przez indukcję ekspresji genu *SCO2* (synthesis of cytochrom c oxidase 2) poprzez białko p53. Zatem powszechnie obserwowana w nowotworach mutacja lub utrata p53 doprowadza do zahamowania fosforylacji oksydacyjnej, nasilenia transportu glukozy przez błonę komórkową oraz intensyfikacji przemian glukozy szlakiem glikolizy, przyczyniając się tym samym do przeprogramowania metabolicznego [79]. Aberracje w szlakach sygnalizacyjnych w komórkach nowotworowych aktywują mTOR-kinazę białkową treoninowo-serynową, której funkcją jest m.in. integracja szlaków sygnalizacyjnych oraz utrzymanie homeostazy energetycznej komórki [20,44]. Do nadrzędnych regulatorów mTOR należą m.in. szlak PI3K/Akt, odpowiadający za kontrolę wzrostu komórki w odpowiedzi na przyłączane do receptorów czynniki wzrostu, jak również szlak LKB1/AMPK, kontrolujący energetyczny status komórki. Kontroli przez mTOR podlegają natomiast omawiane czynniki transkrypcyjne HIF-1 i c-MYC, które – jak wspomniano wcześniej – nasilają ekspresję białek zaangażowanych w proces glikolizy. W związku z tym aktywacja mTOR również wydaje się ważnym mechanizmem prowadzącym do efektu Warburga [98,99]. Niezależnie od nadrzędnej kontroli nad mTOR Akt stymuluje także bezpośrednio ekspresję i translokację receptorów GLUT w kierunku błony komórkowej oraz aktywację HK i PFK-2 [19].

MECHANIZM PRZEPROGRAMOWANIA METABOLICZNEGO – EFEKT CRABTREE

W wielu nowotworach obserwuje się indukowane glukozą przełączenie z metabolizmu tlenowego na metabolizm oparty wyłącznie na glikolizie. Zjawisko to określa się efektem Crabtree, a jego mechanizm nie został jak dotąd wyjaśniony. Dotychczasowe badania sugerują, że indukcja efektu Crabtree może być wynikiem działania wielu czynników [24]. Jedną z hipotez mówi o konkurencyjnym zużyciu ADP przez enzymy glikolizy (kinazę fosfoglicerynianową, kinazę pirogronianową) w stosunku do mitochondrium. W związku z tym, że ADP jest substratem niezbędnym do przeprowadzenia fosforylacji oksydacyjnej, jego spadek w mitochondrium, będący skutkiem intensywnie zachodzącej glikolizy, może doprowadzić do zahamowania syntazy ATP, a tym samym zahamowania reakcji zachodzących w łańcuchu oddechowym [31]. Wydaje się jednak, że nie jest to główny czynnik prowadzący do efektu Crabtree, bowiem mitochondrialna translokaza ADP charakteryzuje się K_m około 100-krotnie niższym dla ADP w stosunku do kinazy fosfoglicerynianowej oraz kinazy pirogronianowej, co sugeruje, że mitochondria, mimo intensywnie zachodzącej glikolizy, nadal mogą korzystać z transportowanego z cytosolu ADP [88]. Jednak prace eksperymentalne wskazały, że podaż fosforanu nieorganicznego eliminuje efekt Crabtree, co pozwoliłoby wnioskować, że fosforanowy potencjał termodynamiczny [ATP/ADP/Pi] może rzeczywiście mieć podstawowe znaczenie dla jego indukcji [70]. Inna z hipotez wskazuje na istotną

rolę fruktozo-1,6-bisfosforanu. Díaz-Ruiz i wsp. wykazali, że powstający w wyniku reakcji katalizowanej przez fosfofruktokinazę I fruktozo-1,6-bisfosforan hamuje aktywność mitochondrialnego kompleksu III i IV, przyczyniając się w ten sposób do zainicjowania efektu Crabtree w komórce [23]. W związku z powyższym można wnioskować, że duża aktywność fosfofruktokinazy I może bezpośrednio indukować przełączenie pomiędzy metabolizmem tlenowym na metabolizm oparty wyłącznie na glikolizie. Należy jednak podkreślić, że fosfofruktokinaza I stanowi główny punkt regulacyjny glikolizy i jej aktywność w komórce podlega ścisłej regulacji allosterycznej. Do głównych allosterycznych inhibitorów PFK-1 zalicza się cząsteczkę ATP, która wiążąc się w miejscu allosterycznym, hamuje PFK-1 w stanie wysokoenergetycznym. Inhibicja może jednak zostać zniesiona przez fruktozo-2,6-bisfosforan, który jest produktem fosfofruktokinazy II (PFK-2) [84], enzymu ulegającego zarówno konstytutywnej, jak i indukowanej nadekspresji w wielu typach nowotworów [5,11,29,32,50,56-59,96]. W związku z tym, że aktywność PFK-1 przyczynia się do wzrostu stężenia fruktozo-1,6-bisfosforanu, można wnioskować, że konstytutywna nadekspresja PFK-2 może się przyczyniać do efektu Warburga, podczas gdy indukowana nadekspresja PFK-2 może być molekularnym włącznikiem efektu Crabtree. Omawiane zależności umiejscawiają cząsteczkę PFK-2 w grupie potencjalnych celów w terapii nowotworowej, gdyż zahamowanie tego enzymu może uniemożliwić przeprogramowanie metaboliczne będące istotą progresji nowotworu. Z hipotezą korelują badania opublikowane przez Kumara i wsp. [43], którzy wykazali, że przywrócenie ekspresji czynnika transkrypcyjnego MTG16 (myeloid tumor gene on chromosome 16) w komórkach chłoniaka Burkitta prowadzi do zahamowania ekspresji PFK-2 oraz PDK-1, przyczyniając się tym samym do obniżenia tempa glikolizy oraz intensyfikacji oddychania tlenowego. Na uwagę zasługuje to, że równocześnie do zmian metabolicznych, będących wynikiem aktywności białka MTG16, zaobserwowano zahamowanie proliferacji oraz zmniejszenie frakcji komórek będących w fazie S. Powyższe dane sugerują, że inhibicja PFK-2 może hamować progresję nowotworu przez uniemożliwienie metabolicznego przeprogramowania [43].

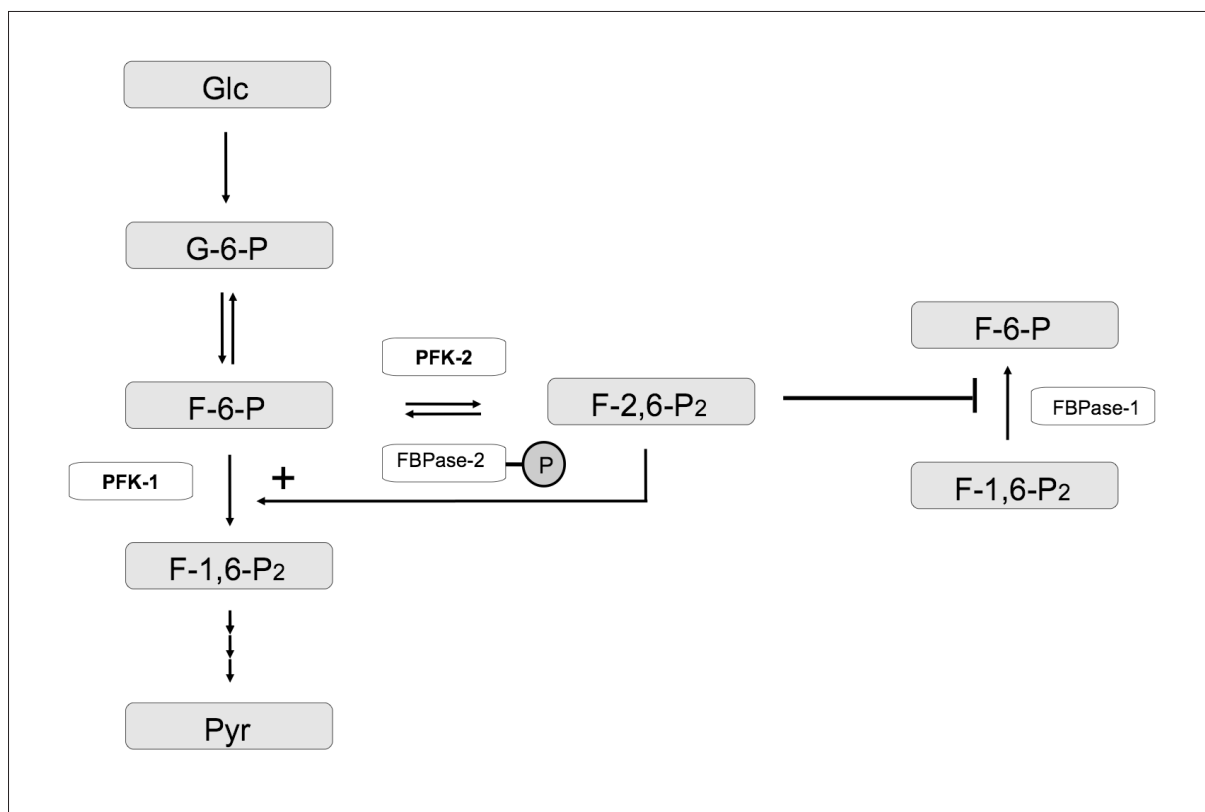
FOSFOFRUKTOKINAZA II

Enzymami glikolitycznymi indukowanymi w procesie kancerogenezy są enzymy z rodziny kinaz fosforylujących fruktozo-6-fosforan [4,66]. Na szczególną uwagę zasługuje wspomniana fosfofruktokinaza II, która oprócz aktywności kinazy (przekształca fruktozo-6-fosforan w fruktozo-2,6-bisfosforan) ma także aktywność fosfatazy (katalizuje hydrolizę fruktozo-2,6-bisfosforanu do fruktozo-6-fosforanu, tj. działa jako fruktozo-2,6-bisfosfataza). Obie domeny katalityczne są obecne w obrębie tego samego polipeptydu, tworząc homodimeryczny kompleks białkowy. Fruktozo-2,6-bisfosforan, będący produktem aktywności katalitycznej domeny kinazowej fosfofruktokinazy II, jest bardzo silnym akty-

watorem allosterycznym fosfofruktokinazy I, która jest głównym enzymem procesu glikolizy [61,66]. Z udziałem ATP PFK-1 katalizuje fosforylację fruktozo-6-fosforanu, tworząc fruktozo-1,6-bisfosforan oraz ADP. Aktywność katalityczna fosfofruktokinazy I jest hamowana przez ATP, cytrynian oraz kwasy tłuszczowe, dostosowując w ten sposób aktywność glikolityczną do potrzeb energetycznych komórki [2,38]. Głównym etapem regulacji glikolizy jest hamowanie fosfofruktokinazy I w stanie wysokoenergetycznym przez ATP, co tworzy pętlę negatywnego sprzężenia zwrotnego [80]. Obecność fruktozo-2,6-bisfosforanu znosi tę inhibicję, znosząc tym samym zależność między poziomem ATP a glikolityczną aktywnością komórki [60,83,85,93]. Jest to szczególnie ważny punkt regulacji w komórkach wątroby, gdyż fruktozo-2,6-bisfosforan pełni tutaj rolę molekularnego przełącznika między glikolizą a glukoneogenezą [65,66]. W przypadku dużego stężenia glukozy w hepatocytach aktywna jest domena kinazowa fosfofruktokinazy II, co powoduje wzrost stężenia fruktozo-2,6-bisfosforanu, a tym samym zwiększa aktywność fosfofruktokinazy I. W sytuacji dużego stężenia glukozy aktywność fosfofruktokinazy II pozwala na utrzymanie intensywnej glikolizy w wątrobie, mimo wysokoenergetycznego stanu komórek. Powstający fruktozo-2,6-bisfosforan hamuje fruktozo-1,6-bisfosfatazę, hamując w ten sposób glukoneogenezę. W przypadku niewielkiego stężenia glukozy, w wyniku działania glukagonu, następuje fosforylacja domeny kinazowej PFK-2, a tym samym jej inaktywacja. Aktywna staje się wówczas domena fosfatazowa, rozkładająca fruktozo-2,6-bisfosforan do fruktozo-6-fosforanu. W wyniku tych reakcji nie jest stymulowana glikoliza i nie jest hamowana glukoneogeneza. Tak więc ścisła regulacja aktywności fosfofruktokinazy II w wątrobie zapewnia dostosowanie tempa glikolizy do aktualnych potrzeb organizmu [64,65,66]. Należy jednak podkreślić, że tak precyzyjny mechanizm regulacyjny jest możliwy tylko dlatego, że izoforma fosfofruktokinazy II podlegająca ekspresji w komórkach wątroby zawiera serynę w pozycji 32, której fosforylacja w odpowiedzi na glukagon hamuje domenę kinazową enzymu. Opisanie zależności przedstawiono na ryc. 2. W komórkach nowotworowych natomiast obserwuje się wysoką ekspresję izoenzymów fosfofruktokinazy II kodowanych przez geny *PFKFB3* i *PFKFB4*, które nie podlegają nadzórnej kontroli endokrynej, pozwalając tym samym na utrzymanie w nowotworach wysokiego tempa glikolizy niezależnie od stanu energetycznego komórek. Duża aktywność fosfofruktokinazy I, będąca następstwem dużego stężenia fruktozo-2,6-bisfosforanu, prowadzi do wysokiego stężenia fruktozo-1,6-bisfosforanu, który może indukować w komórkach nowotworowych przełączenie między metabolizmem tlenowym a metabolizmem opartym wyłącznie na glikolizie [23].

GENY KODUJĄCE FOSFOFRUKTOKINAZĘ II

W komórkach ssaczych fosfofruktokinaza II występuje w postaci kilku izoenzymów kodowanych przez 4 różne geny: *PFKFB1*, *PFKFB2*, *PFKFB3*, *PFKFB4*, umiejscowione na



Ryc. 2. Regulacja glikolizy i glukoneogenezy w hepatocytach. Pogrubione symbole wskazują reakcję fosforylacji fruktozo-6-fosforanu przez fosfofruktokinazę 1 (PFK-1) oraz fosfofruktokinazę 2 (PFK-2). Znak plus - wzrost aktywności PFK-1 pod wpływem fruktozo-2,6-bisfosforanu, natomiast strzałka z tępym końcem wskazuje na hamowanie przez fruktozo-1,6-bisfosforan reakcji katalizowanej przez fruktozo-2,6-bisfosfatazę 2; F-1,6-P2 – fruktozo-1,6-bisfosforan; F-2,6-P2 – fruktozo-2,6-bisfosforan; F-6-P – fruktozo-6-fosforan; FBPase-1 – fruktozo-1,6-bisfosfataza 1; FBPase-2 – fruktozo-2,6-bisfosfataza 2; G-6-P – glukoza-6-fosforan; Glc – glukoza; P – grupa fosforanowa; PFK-1 – fosfofruktokinaza 1; PFK-2 – fosfofruktokinaza 2; PK – kinaza pirogronianowa; Pyr – pirogronian

odrębnych chromosomach [61,68]. W wyniku alternatywnego składania oraz alternatywnych promotorów [6] ekspresja każdego z genów generuje ekspresję różnych izoform. Mimo wysokiej homologii domeny katalitycznej izoenzymy fosfofruktokinazy i ich izoformy wykazują odmienne właściwości regulacyjne oraz katalityczne. W komórkach obserwuje się koekspresję różnych izoenzymów oraz ich izoform, co sugeruje ich wzajemną kooperację w regulacji stężenia fruktozo-2,6-bisfosforanu [51,71]. Gen *PFKFB1* zawiera 17 eksonów i koduje 3 różne izoformy fosfofruktokinazy II (L, M i F). Izoformy te różnią się jedynie sekwencją eksonu 1. Izoforma L ulega ekspresji w komórkach wątroby, mięśni oraz w białej tkance tłuszczowej. Charakterystycznym elementem struktury tej izoformy jest seryna w pozycji 32 białka, która jest miejscem regulacji hormonalnej. Izoformy M, występująca w mięśniach i białej tkance tłuszczowej oraz F, ulegająca ekspresji w fibroblastach oraz tkankach płodowych, nie mają seryny w pozycji 32 charakterystycznej dla izoformy L [18,26,61,72]. Gen *PFKFB2* ulegający ekspresji w komórkach kardiomiocytów koduje 4 różne izoformy fosfofruktokinazy II różniące się między sobą regionem niekodującym na końcu 5'. W wyniku alternatywnego składania powstają dwie główne izoformy różniące się między sobą sekwencją reszt aminokwasowych

na końcu karboksylowym. Obie izoformy mają domenę regulatorową na końcu karboksylowym, która ulegając fosforylacji, uaktywnia domenę kinazową enzymu. Fosforylacja Ser466 powoduje wzrost V_{max} domeny kinazowej, podczas gdy fosforylacja Ser466 i Ser483 jest niezbędna do obniżenia wartości K_m domeny kinazowej, co zwiększa powinowactwo enzymu do substratu, jakim jest fruktozo-6-fosforan [9,21,22,68]. Izoenzym PFK-2 w kardiomiocytach może być fosforylowany przez wiele kinaz w odpowiedzi na insulinę, jak również przez AMPK kinazę, która ulega aktywacji przy wzroście stężenia AMP. W przypadku izoenzymu fosfofruktokinazy II, będącej produktem genu *PFKFB3*, wykazano większą aktywność domeny kinazowej w stosunku do domeny fosfatazowej [13]. Produktem genu *PFKFB3* są dwie główne izoformy, jedną z nich jest izoforma wykazująca ekspresję konstytutywną, a drugą izoforma wykazująca ekspresję indukowaną [56]. Izoforma indukowana ulega ekspresji w komórkach intensywnie proliferujących, tj. w komórkach nowotworowych, nabłonkowych oraz układu immunologicznego, a charakterystyczna dla niej sekwencja AUUUA występująca na końcu 3' warunkuje niestabilność, a tym samym szybką degradację cząsteczki mRNA [13]. Obecność sekwencji AUUUA wykazano również w transkryptach niektórych protoonkogenów oraz

prozapalnych cytokin [1], które także charakteryzują się szybkim obrotem intensywnie powstających cząstek mRNA (mRNA turnover). W pozycji 461 izoformy indukowanej występuje seryna, której fosforylacja przez kinazy regulatorowe zwiększa aktywność domeny kinazowej, a tym samym przyczynia się do nasilenia glikolizy [58]. Innym izoenzymem PFK-2 ulegającym nadekspresji w komórkach nowotworowych jest produkt genu *PFKFB4*. Struktura izoform PFK-2 kodowanych przez ten gen jest bardzo podobna, a fragment kodujący domenę katalityczną jest wysoce konserwatywny. Różnice występują natomiast w odcinkach N- oraz C-końcowych i prawdopodobnie są odpowiedzialne za różnice aktywności w domenach fosfatazowej i kinazowej [72]. Wysoką ekspresję zarówno genu *PFKFB4* [14,33,71,100], jak i genu *PFKFB3* [5,11,32,57,94,96] wykazano w licznych nowotworach, co sugeruje, że izoenzymy kodowane właśnie przez te geny mają znaczenie w procesie kancerogenezy.

REGULACJA EKSPRESJI *PFKFB3* I *PFKFB4*

Wiele doniesień wskazuje na wysoką ekspresję *PFKFB3* w nowotworach, a czynnik HIF-1 wydaje się głównym regulatorem ekspresji *PFKFB3* na poziomie transkrypcji. Białko HIF-1 przez przyłączenie się do sekwencji HRE obecnych w promotorze genu *PFKFB3* [59] wpływa na wzrost stężenia tego enzymu w komórkach nowotworowych znajdujących się w środowisku niskotlenowym [50]. Ekspresja *PFKFB3* na poziomie mRNA jest również stymulowana przez aktywację szlaku kinaz MAPK (mitogen-activated protein kinase) oraz przez czynniki stresogenne, takie jak H_2O_2 , NaCl, promieniowanie UV czy też anisomycynę [58]. Warto jeszcze raz podkreślić, że aktywacja szlaku kinaz MAP prowadzi równoległe do wzrostu aktywności enzymu (PFK-2) przez fosforylację seryny w pozycji 461 [49]. Regulacja transkrypcji *PFKFB3* wydaje się także podlegać regulacji hormonalnej. W nowotworze piersi dotychczasowe wyniki badań podkreślają istotny wpływ progesteronu i estradiolu na poziom ekspresji *PFKFB3*. Dla obu hormonów wykazano klasyczny (genomowy) mechanizm działania, który polega na związaniu się hormonu z receptorem, translokacji do jądra komórkowego, dimeryzacji i wiązaniu się do swoistych elementów odpowiedzi w DNA, których obecność potwierdzono w promotorze genu *PFKFB3* [36,57]. W przypadku regulacji ekspresji *PFKFB3* na poziomie białka istotną rolę odgrywa jądrowa postać fosfatazy PTEN, której aktywność promuje łączenie się białka APC, będącego ligazą E3 z białkiem adaptorowym CDH1, wzmacniając tym samym supresorowe działanie kompleksu APC/CDH1 [81], zaangażowanego m.in. w proces degradacji *PFKFB3* [3,35]. W pracach badawczych potwierdzono, że utrata ekspresji białka PTEN w mysich fibroblastach powoduje wzrost ekspresji *PFKFB3*, a tym samym podnosi stężenie fruktozo-2-6-bisfosforanu i aktywacji fosfofruktokinazy-1, podczas gdy ponowne wprowadzenie ekspresji PTEN obniża stężenie fruktozo-2,6-bisfosforanu oraz redukuje stężenie mleczanu. Bardzo ciekawe badania przeprowadzone na myszach transgenicznym z nadekspresją białka PTEN przez Garcíę-Cao i wsp. [30] wyka-

zują, że komórki tych organizmów charakteryzują się zmniejszonym zużyciem glukozy i zwiększoną intensywnością oddychania tlenowego, a co najważniejsze, większą opornością na transformację nowotworową [30]. Powyższe dane wydają się potwierdzać to, że fosfataza PTEN ma istotne znaczenie w regulacji ekspresji *PFKFB3* na poziomie białka, a utrata ekspresji PTEN może się bezpośrednio przyczyniać do przeprogramowania metabolicznego komórek nowotworowych. Poziom *PFKFB3* kontrolowany jest także przez modyfikację kowalencyjną białka jaką jest metylacja. Postać *PFKFB3* asymetrycznie, podwójnie zmetylowana, w miejscach Arg131 i Arg134, przyczynia się do zwiększenia stężenia F-2,6- P_2 , a tym samym aktywuje PFK-1 i zwiększa przemianę glukozy w szlaku glikolizy, podczas gdy postać niezmetylowana *PFKFB3* ulega poliubikwitynacji i następnie degradacji w proteasomie, powodując spadek stężenia F-2,6- P_2 , co obniża aktywność PFK-1 oraz zmniejsza tempo glikolizy. Ilość zmetylowanej *PFKFB3* zależy m.in. od aktywności syntazy β -cystationinowej. W wyniku niewielkiej aktywności tego enzymu w komórce gromadzi się S-adenozylhomocystyna (SAH), która allosterycznie blokuje metylotransferazy [37]. Mała aktywność syntazy β -cystationinowej jest obserwowana w czasie stresu oksydacyjnego, kiedy to indukowana jest oksygenaza hemowa, która generuje tlenek węgla, a on hamuje aktywność syntazy β -cystationiny. Podsumowując, stres oksydacyjny zmniejsza ilości aktywnej zmetylowanej PFK-2, co powoduje przesunięcie metabolizmu glukozy do szlaku pentozofosforanowego, dostarczającego NADPH, który odnawia komórkowe zapasy zredukowanego glutationu, chroniąc tym samym komórki przed wpływem stresu oksydacyjnego. Komórki takie doskonale radzą sobie z unieszkodliwianiem wolnych rodników, ale także dzięki tej zdolności zyskują oporność na chemioterapię i radioterapię [97]. Stres oksydacyjny wpływa hamująco na *PFKFB3* również przez zmiany w stężeniu glutationu. Dzieje się tak na skutek znacznego spadku zredukowanego glutationu w komórce związanego z jego zużyciem podczas neutralizacji wolnych rodników. Zwiększa to ilość utlenionej postaci glutationu, promując przyłączenie reszty S-glutationowej do cysteiny w pozycji 206 znajdującej się w okolicy miejsca aktywnego *PFKFB3*, co znacząco zmniejsza aktywność katalitycznej enzymu i podobnie jak w przypadku metylacji *PFKFB3* przesuwają metabolizm glukozy do szlaku pentozofosforanowego, dostarczającego NADPH. Opisane mechanizmy wskazują na bardzo precyzyjną regulację fosfofruktokinazy II w zależności od stanu redox komórki [76]. Jednocześnie obserwuje się mechanizmy epigenetyczne kontrolujące ekspresję *PFKFB3*. W nowotworze kości obniżone stężenie microRNA (miR-26b) bezpośrednio przyczynia się do wzrostu ekspresji *PFKFB3*, a prace eksperymentalne dowodzą, że przywrócenie ekspresji miR-26b *in vitro* obniża stężenie *PFKFB3* oraz zahamowuje proliferację, migrację, inwazję oraz zmniejsza przemianę glukozy za pośrednictwem glikolizy [25]. Natomiast w przypadku nowotworu piersi, ekspresja *PFKFB3* wydaje się negatywnie regulowana przez miR-206. W badaniach prowadzonych przez Ge

i wsp. [32] udowodniono, że 17- β -estradiol wpływa na obniżenie stężenia miR-206 w komórkach nowotworu piersi pozytywnych dla receptora estrogenowego. Istotne znaczenie miR-206 w regulacji ekspresji *PFKFB3* potwierdzono przez wprowadzenie *in vitro* nadekspresji miR-206, co doprowadziło do zmniejszenia stężenia fruktozo-2,6-bisfosforanu, obniżenia wytwarzania mleczanu oraz redukcji proliferacji i migracji komórek nowotworu piersi [32].

Czynnik transkrypcyjny HIF-1 jest zaangażowany także w mechanizm regulacji wysokiej ekspresji *PFKFB4* w nowotworach. W promotorze genu *PFKFB4* [14,52], podobnie jak w promotorze *PFKFB3* [29,50], znajdują się miejsce wiązania czynnika transkrypcyjnego HIF-1. Poza potwierdzoną rolę hipoksji w regulacji ekspresji *PFK-2*, kodowanej przez gen *PFKFB4*, badanie przeprowadzone przez Li i wsp. [45] wykazały, że drastyczne obniżenie stężenia glukozy w komórkach nowotworu wątroby HepG2 redukuje ekspresję *PFKFB4*. Spadek ekspresji *PFKFB4* skorelowany był ze spadkiem ekspresji oksygenazy hemowej-2 (HO-2) oraz wzrostem ekspresji oksygenazy hemowej-1 (HO-1), podczas gdy nadekspresja HO-2 indukowała wzrost ekspresji *PFKFB4* [45]. Badania wydają się potwierdzać istnienie wzajemnej regulacji między stężeniem glukozy, ekspresją *PFKFB4* oraz katabolizmem hemu.

FOSFOFRUKTOKINAZA II W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH

Wiele badań wskazuje na występowanie ścisłej korelacji między karcinogenezą a podwyższoną aktywnością fosfofruktokinazy II, co potwierdzono w nowotworach stercza, gruczołu piersiowego, pęcherza, jajnika, szyjki macicy, tarczycy, okrężnicy, żołądka, płuc, trzustki, kości oraz w glejakach [5,10,11,14,25,32,33,53,54,71,100]. Jak już wspomniano, jedną z głównych funkcji glikolizy w komórkach nowotworowych jest generowanie produktów pośrednich, podstawowych dla ich przeżycia [12,47]. Intensywna biosynteza niezbędnych komórce intermedatów jest możliwa tylko przez utrzymanie dużej aktywności glikolitycznej, niezależnie od stanu energetycznego komórki [95]. W związku z tym, duża aktywność enzymu generującego fruktozo-2,6-bisfosforan wydaje się bardzo pożądana w nowotworach. W obliczu dotychczasowych badań wykazano, że w komórkach nowotworowych najczęściej nadekspresji ulegają izoformy kodowane przez geny *PFKFB3* oraz *PFKFB4* [5,7,8,14,71,100]. *PFKFB3* charakteryzuje się bardzo wysokim stosunkiem aktywności domeny kinazowej do domeny fosfatazowej (740:1) [13], co sprawia, że izoenzym ten jest głównym źródłem fruktozo-2,6-bisfosforanu w wielu rozwijających się nowotworach. Wyciszenie ekspresji *PFKFB3* w komórkach nowotworu szyjki macicy znacznie obniża stężenie fruktozo-2,6-bisfosforanu oraz ich aktywność glikolityczną, obniżając żywotność oraz zahamowując niezależny od kontaktu komórkowego wzrost [11]. W nowotworze kości natomiast obniżenie ekspresji *PFKFB3* powoduje zahamowanie proliferacji, migracji i inwazji oraz zmniejsza przemianę glukozy w szlaku glikolizy. Podobne dane otrzymano, analizując komórki nowotworu piersi,

gdzie wyciszenie ekspresji *PFKFB3* skutkowało obniżeniem wytwarzania mleczanu oraz redukcją proliferacji i migracji komórek. Telang i wsp. wykazali, że transformacja mysich fibroblastów płucnych onkogenem H-ras indukuje niezależny od kontaktu komórkowego wzrost tylko w fibroblastach izolowanych od myszy o genotypie *PFKFB3+/+*, natomiast niezależny od kontaktu komórkowego wzrost nie był obserwowany u myszy o genotypie *PFKFB3+/-*. Wykazano, że fibroblasty o genotypie *PFKFB3+/-* mają obniżone stężenie fruktozo-2,6-bisfosforanu w porównaniu z fibroblastami *PFKFB3+/+* [82]. Można sugerować, że brak hamowania fosfofruktokinazy I przez ATP może mieć istotne znaczenie w indukowanej onkogenem H-ras transformacji fibroblastów, a przeprowadzone badania wskazują na bezpośredni związek między wysoką ekspresją *PFKFB3*, prowadzącą do intensyfikacji glikolizy, a procesem kancerogenezy. Znacząca jest także rola domeny kinazowej *PFKFB3*, która nie ogranicza się wyłącznie do stymulacji glikolizy. Yalcin i wsp. wykazali, że jeden z wariantów składowania nr 5, *PFKFB3* [39], najczęściej ulegający ekspresji w komórkach nowotworowych [78], umiejscawia się w jądrze komórkowym, podczas gdy lokalizacja *PFKFB4* była wyłącznie cytoplazmatyczna [94]. Jądrowe umiejscowienie *PFKFB3* zaobserwowano *in vitro* w nowotworze okrężnicy, piersi oraz szyjki macicy, a domena karboksylowa okazała się podstawowa dla pojawienia się białka w jądrze komórkowym. Eksperymentalna nadekspresja *PFKFB3* w nowotworze szyjki macicy wykazała wzrost stężenia głównych białek cyklu komórkowego, tj. cyklinozależnej kinazy 1 (CDK1), białka Cdc25C oraz cykliny D3. Jednocześnie zaobserwowano zwiększoną fosforylację treoniny 187 białka p27, prowadzącą do destabilizacji i degradacji tego białka. Fosforylacja p27 nie wynikała bezpośrednio z aktywności domeny kinazowej *PFKFB3*, ale jak wykazano, była wynikiem wzrostu stężenia fruktozo-2,6-bisfosforanu w jądrze komórkowym [94]. Yalcin i wsp. założyli hipotetycznie, że w zależności od rodzaju stymulacji komórki może dochodzić do wzrostu stężenia fruktozo-2,6-bisfosforanu w cytoplazmie, co promuje glikolizę lub do wzrostu stężenia fruktozo-2,6-bisfosforanu w jądrze komórkowym, co bezpośrednio przyczynia się do podniesienia potencjału proliferacyjnego. Autorzy zasugerowali, że fruktozo-2,6-bisfosforan może działać jako bezpośredni aktywator allosteryczny Cdk1. W fazie G1 cyklu komórkowego Cdk1 jest nieaktywna z powodu małego poziomu ekspresji cykliny A i cykliny B1, podstawowych dla jej aktywacji. Zatem allosteryczna aktywacja Cdk1 przez fruktozo-2,6-bisfosforan prowadząc do fosforylacji białka p27 oraz białka retinoblastomy (Rb), może wpływać na deregulację i skrócenie fazy G1, co często stwierdza się w nowotworach [94]. Yalcin i wsp. wykazali, że wyciszenie endogennej ekspresji *PFKFB3* w komórkach nowotworu szyjki macicy powodowało zahamowanie aktywności Cdk1, stabilizację białka p27 oraz zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1, natomiast wyciszenie endogennej ekspresji *PFKFB3* było całkowicie zniesione, jeżeli jednocześnie wyciszona została ekspresja p27. Badania te sugerują, że fruktozo-2,6-bisfosforan może łączyć niezależnie funkcję aktywatora glikolizy oraz stymulatora proliferacji [94,96]. Niewątpliwie jest to bardzo istotna obserwacja i ważne jest zweryfikowanie

jądrowej lokalizacji PFKFB3 również w innych nowotworach. Nie bez powodu podkreśla się także funkcję PFKFB4 w komórkach nowotworowych. Wyciszenie ekspresji PFKFB4 w komórkach glejaków prowadziło do ich apoptozy [33], a nowotworowe komórki macierzyste w glejakach charakteryzowały się podniesioną ekspresją PFKFB4, podczas gdy ekspresja PFKFB3 była obniżona, co sugeruje, że główną rolę w utrzymaniu optymalnego stężenia fruktozo-2,6-bisfosforanu pełni w tych komórkach PFKFB4. Inne doniesienia podkreślają istotne znaczenie PFKFB4 dla progresji nowotworu stercza [70]. W komórkach tych w białku kodowanym przez PFKFB4 dominuje aktywność domeny fosfatazowej, a to w wyniku wyciszenia PFKFB4 prowadziło do wzrostu stężenia fruktozo-2,6-bisfosforanu w trzech z czterech badanych linii komórkowych. Wzrost fruktozo-2,6-bisfosforanu doprowadził do przekierowania glukozy-6-fosforanu na drogę glikolizy, co zmniejszyło jego dostępność dla cyklu pentozofosforanowego, a tym samym obniżone zostało stężenie NADPH oraz zredukowanego glutationu. W wyniku obserwowanych zmian nasilił się stres oksydacyjny oraz śmierć komórkowa. Zastosowanie antyutleniaczy całkowicie odwróciło efekt wyciszenia PFKFB4 [71]. Opisanie badania wydaje się kontrowersyjne w odniesieniu do hipotezy, która zakłada, że duże stężenie fruktozo-2,6-bisfosforanu promuje progresję nowotworu przez stymulację aktywności glikolitycznej. Jednak można rozważać, że duże stężenie fruktozo-2,6-bisfosforanu jest istotne tylko dla nowotworowych komórek znajdujących się w środowisku hipoksycznym, ponieważ nasiloną glikolizę pozwoli na utrzymanie odpowiedniego poziomu ATP w komórce i przeżycie. W warunkach normoksycznych natomiast obniżone stężenie fruktozo-2,6-bisfosforanu umożliwiać może przekierowanie gromadzącego się glukozy-6-fosforanu na drogę szlaku pentozofosforanowego, indukując biosyntezę pentoz oraz NADPH niezbędnych dla syntezy redukcyjnych i ochrony komórki przed RFT. W związku z tym szczególnie istotna dla komórki nowotworowej wydaje się modulacja aktywności domeny kinazowej oraz fosfatazowej w zależności od wymagań mikrośrodowiska. Najnowsze badania Chesneya i wsp. nie potwierdzają

jednak przewagi aktywności domeny fosfatazowej PFKFB4 [14]. W badaniach na nowotworach, w tym także na nowotworze stercza, autorzy wykazali, że wyciszenie lub selektywne hamowanie ekspresji PFKFB4 obniża stężenie fruktozo-2,6-bisfosforanu, zmniejsza pobór glukozy oraz prowadzi do spadku ilości ATP w komórce. Dodatkowo, Chesney i wsp. wskazali, że PFKFB4 jest najważniejszym enzymem dla przeżycia komórek nowotworowych w warunkach hipoksji, wzmagając glikolityczne wytwarzanie ATP, w czasie gdy niemożliwe jest funkcjonowanie łańcucha oddechowego. Dostępność tlenu, szybkość zachodzących procesów metabolicznych, przepływ i dostępność intermedatów glikolizy, a także ich wzajemne oddziaływanie wydają się istotne w regulacji prawidłowych i nowotworowych procesów w komórkach. Bez wątpliwości można stwierdzić, że dalsze prace badawcze są konieczne, aby zweryfikować przeciwstawne wyniki publikowane przez różne grupy badawcze, co powinno zaowocować opracowaniem odpowiedniej terapii w walce z różnymi typami nowotworów.

PODSUMOWANIE

W komórkach nowotworowych powszechnie obserwuje się przeprogramowanie metabolizmu w kierunku procesu intensywnie zachodzącej beztlenowej glikolizy. Wzrost szybkości przemian glukozy w wyniku glikolizy w znacznym stopniu wynika z nadekspresji enzymów glikolitycznych. Jednym z enzymów mających bardzo istotny wpływ na tempo glikolizy jest fosfofruktokinaza II. Publikowane dane jednoznacznie wskazują na istnienie korelacji między wysoką ekspresją fosfofruktokinazy II a agresywnością nowotworu. Niewątpliwie dokładniejsze poznanie mechanizmów i konsekwencji wysokiej ekspresji fosfofruktokinazy II przyczyni się do lepszego zrozumienia podstaw przeprogramowania metabolicznego nowotworów, co w przyszłości może zaowocować pojawieniem się nowych leków skutecznie uderzających w zmieniony metabolizm komórek nowotworowych.

PIŚMIENICTWO

- [1] Akashi M., Shaw G., Hachiya M., Elstner E., Suzuki G., Koeffler P.: Number and location of AUUUA motifs: role in regulating transiently expressed RNAs. *Blood*, 1994; 83: 3182-3187
- [2] Al Hasawi N., Alkandari M.F., Luqmani Y.A.: Phosphofruktokinase: a mediator of glycolytic flux in cancer progression. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2014; 92: 312-321
- [3] Almeida A., Bolanos J.P., Moncada S.: E3 ubiquitin ligase APC/C-Cdh1 accounts for the Warburg effect by linking glycolysis to cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 107: 738-741
- [4] Altenberg B., Greulich K.O.: Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics*, 2004; 84: 1014-1020
- [5] Atsumi T., Chesney J., Metz C., Leng L., Donnelly S., Makita Z., Mitchell R., Bucala R.: High expression of inducible 6-phosphofruktokinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFK-2; PFKFB3) in human cancers. *Cancer Res.*, 2002; 62: 5881-5887
- [6] Baek D., Davis C., Ewing B., Gordon D., Green P.: Characterization and predictive discovery of evolutionarily conserved mammalian alternative promoters. *Genome Res.*, 2007; 17: 145-155
- [7] Bando H., Atsumi T., Nishio T., Niwa H., Mishima S., Shimizu C., Yoshioka N., Bucala R., Koike T.: Phosphorylation of the 6-phosphofruktokinase/fructose 2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 5784-5792
- [8] Bartrons R., Caro J.: Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2007; 39: 223-229
- [9] Bertrand L., Alessi D.R., Deprez J., Deak M., Viaene E., Rider M.H., Hue L.: Heart 6-phosphofruktokinase activation by insulin results from Ser-466 and Ser-483 phosphorylation and requires 3-phosphoinositide-dependent kinase-1, but not protein kinase B. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 30927-30933
- [10] Bobarykina A.Y., Minchenko D.O., Opentanova I.L., Moenner M., Caro J., Esumi H., Minchenko O.H.: Hypoxic regulation of PFKFB-3 and PFKFB-4 gene expression in gastric and pancreatic cancer cell

lines and expression of *PFKFB* genes in gastric cancers. *Acta Biochim. Pol.*, 2006; 53: 789-799

[11] Calvo M.N., Bartrons R., Castano E., Perales J.C., Navarro-Sabate A., Manzano A.: PFKFB3 gene silencing decreases glycolysis, induces cell-cycle delay and inhibits anchorage-independent growth in HeLa cells. *FEBS Lett.*, 2006; 580: 3308-3314

[12] Cantor J.R., Sabatini D.M.: Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer Discov.*, 2012; 2: 881-898

[13] Chesney J., Clark J., Klarer A.C., Imbert-Fernandez Y., Lane A.N., Telang S.: Fructose-2,6-bisphosphate synthesis by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 (PFKFB4) is required for the glycolytic response to hypoxia and tumor growth. *Oncotarget*, 2014; 5: 6670-6686

[14] Chesney J., Mitchell R., Benigni F., Bacher M., Spiegel L., Al-Abed Y., Han J.H., Metz C., Bucala R.: An inducible gene product for 6-phosphofructo-2-kinase with an AU-rich instability element: Role in tumor cell glycolysis and the Warburg effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 3047-3052

[15] Christofk H.R., Vander-Heiden M.G., Harris M.H., Ramanathan A., Gerszten R.E., Wei R., Fleming M.D., Schreiber S.L., Cantley L.C.: The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*, 2008; 452: 230-233

[16] Dang C.V.: MYC on the path to cancer. *Cell*, 2012; 149: 22-35

[17] Dang C.V.: Rethinking the Warburg effect with Myc micromanaging glutamine metabolism. *Cancer Res.*, 2010; 70: 859-862

[18] Darville M.I., Antoine I.V., Rousseau G.G.: Characterization of an enhancer upstream from the muscle-type promoter of a gene encoding 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Nucleic Acids Res.*, 1992; 20: 3575-3583

[19] DeBerardinis R.J., Lum J.J., Hatzivassiliou G., Thompson C.B.: The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.*, 2008; 7: 11-20

[20] Dennis P.B., Jaeschke A., Saitoh M., Fowler B., Kozma S.C., Thomas G.: Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science*, 2001; 294: 1102-1105

[21] Deprez J., Bertrand L., Alessi D.R., Krause U., Hue L., Rider M.H.: Partial purification and characterization of a wortmannin-sensitive and insulin-stimulated protein kinase that activates heart 6-phosphofructo-2-kinase. *Biochem. J.*, 2000; 347: 305-312

[22] Deprez J., Vertommen D., Alessi D.R., Hue L., Rider M.H.: Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 17269-17275

[23] Diaz-Ruiz R., Averet N., Araiza D., Pinson B., Uribe-Carvajal S., Devin A., Rigoulet M.: Mitochondrial oxidative phosphorylation is regulated by fructose 1,6-bisphosphate. A possible role in Crabtree effect induction? *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 26948-26955

[24] Diaz-Ruiz R., Rigoulet M., Devin A.: The Warburg and Crabtree effects: on the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011; 1807: 568-576

[25] Du J.Y., Wang L.F., Wang Q., Yu L.D.: miR-26b inhibits proliferation, migration, invasion and apoptosis induction via the down-regulation of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 driven glycolysis in osteosarcoma cells. *Oncol. Rep.*, 2015; 33: 1890-1898

[26] Dupriez V.J., Darville M.I., Antoine I.V., Gegonne A., Ghysdael J., Rousseau G.G.: Characterization of a hepatoma mRNA transcribed from a third promoter of a 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-encoding gene and controlled by *ets* oncogene-related products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993; 90: 8224-8228

[27] Fais S., Venturi G., Gatenby B.: Microenvironmental acidosis in carcinogenesis and metastases: New strategies in prevention and

therapy. *Cancer Metastasis Rev.*, 2014; 33: 1095-1108

[28] Fernandez-Checa J.C., Kaplowitz N., Garcia-Ruiz C., Colell A., Miranda M., Mari M., Ardite E., Morales A.: GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *Am. J. Physiol.*, 1997; 273: G7-G17

[29] Fukasawa M., Tsuchiya T., Takayama E., Shinomiya N., Uyeda K., Sakakibara R., Seki S.: Identification and characterization of the hypoxia-responsive element of the human placental 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. *J. Biochem.*, 2004; 136: 273-277

[30] Garcia-Cao I., Song M.S., Hobbs R.M., Laurent G., Giorgi C., de Boer V.C., Anastasiou D., Ito K., Sasaki A.T., Rameh L., Carracedo A., Vander Heiden M.G., Cantley L.C., Pinton P., Haigis M.C., Pandolfi P.P.: Systemic elevation of PTEN induces a tumor-suppressive metabolic state. *Cell*, 2012; 149: 49-62

[31] Gatt S., Racker E.: Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. I. Crabtree effect in reconstructed systems. *J. Biol. Chem.*, 1959; 234: 1015-1023

[32] Ge X., Lyu P., Cao Z., Li J., Guo G., Xia W., Gu Y.: Overexpression of miR-206 suppresses glycolysis, proliferation and migration in breast cancer cells via PFKFB3 targeting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2015; 463: 1115-1121

[33] Goidts V., Bageritz J., Puccio L., Nakata S., Zapatka M., Barbus S., Toedt G., Campos B., Korshunov A., Momma S., Van Schaftingen E., Reifemberger G., Herold-Mende C., Lichter P., Radlwimmer B.: RNAi screening in glioma stem-like cells identifies PFKFB4 as a key molecule important for cancer cell survival. *Oncogene*, 2012; 31: 3235-3243

[34] Hanahan D., Weinberg R.A.: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011; 144: 646-674

[35] Herrero-Mendez A., Almeida A., Fernandez E., Maestre C., Moncada S., Bolanos J.P.: The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nat. Cell Biol.*, 2009; 11: 747-752

[36] Imbert-Fernandez Y., Clem B.F., O'Neal J., Kerr D.A., Spaulding R., Lanceta L., Clem A.L., Telang S., Chesney J.: Estradiol stimulates glucose metabolism via 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3). *J. Biol. Chem.*, 2014; 289: 9440-9448

[37] James S.J., Melnyk S., Pogribna M., Pogribny I.P., Caudill M.A.: Elevation in S-adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: Potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology. *J. Nutr.*, 2002; 132: 2361S-2366S

[38] Jenkins C.M., Yang J., Sims H.F., Gross R.W.: Reversible high affinity inhibition of phosphofructokinase-1 by acyl-CoA: a mechanism integrating glycolytic flux with lipid metabolism. *J. Biol. Chem.*, 2011; 286: 11937-11950

[39] Kessler R., Eschrich K.: Splice isoforms of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in human brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 2001; 87: 190-195

[40] Kim J.W., Gao P., Liu Y.C., Semenza G.L., Dang C.V.: Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Mol. Cell Biol.*, 2007; 27: 7381-7393

[41] Kim J.W., Zeller K.I., Wang Y., Jegga A.G., Aronow B.J., O'Donnell K.A., Dang C.V.: Evaluation of myc E-box phylogenetic footprints in glycolytic genes by chromatin immunoprecipitation assays. *Mol. Cell Biol.*, 2004; 24: 5923-5936

[42] Koppenol W.H., Bounds P.L., Dang C.V.: Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat. Rev. Cancer*, 2011; 11: 325-337

[43] Kumar P., Gullberg U., Olsson I., Ajore R.: Myeloid translocation gene-16 co-repressor promotes degradation of hypoxia-inducible factor 1. *PLoS One*, 2015; 10: e0123725

- [44] Laplante M., Sabatini D.M.: mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 2012; 149: 274-293
- [45] Li B., Takeda K., Ishikawa K., Yoshizawa M., Sato M., Shibahara S., Furuyama K.: Coordinated expression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 and heme oxygenase 2: Evidence for a regulatory link between glycolysis and heme catabolism. *Tohoku J. Exp. Med.*, 2012; 228: 27-41
- [46] Liou G.Y., Storz P.: Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res.*, 2010; 44: 479-496
- [47] Locasale J.W., Cantley L.C.: Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth. *Cell Metab.*, 2011; 14: 443-451
- [48] Manola J., Atkins M., Ibrahim J., Kirkwood J.: Prognostic factors in metastatic melanoma: A pooled analysis of Eastern Cooperative Oncology Group trials. *J. Clin. Oncol.*, 2000; 18: 3782-3793
- [49] Marsin A.S., Bouzin C., Bertrand L., Hue L.: The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 30778-30783
- [50] Minchenko A., Leshchinsky I., Opentanova I., Sang N., Srinivas V., Armstead V., Caro J.: Hypoxia-inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) gene. Its possible role in the Warburg effect. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 6183-6187
- [51] Minchenko O., Opentanova I., Caro J.: Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family (PFKFB-1-4) expression in vivo. *FEBS Lett.*, 2003; 554: 264-270
- [52] Minchenko O., Opentanova I., Minchenko D., Ogura T., Esumi H.: Hypoxia induces transcription of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 gene via hypoxia-inducible factor-1 α activation. *FEBS Lett.*, 2004; 576: 14-20
- [53] Minchenko O.H., Ogura T., Opentanova I.L., Minchenko D.O., Ochiai A., Caro J., Komisarenko S.V., Esumi H.: 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family overexpression in human lung tumor. *Ukr. Biokhim. Zh.*, 2005; 77: 46-50
- [54] Minchenko O.H., Opentanova I.L., Ogura T., Minchenko D.O., Komisarenko S.V., Caro J., Esumi H.: Expression and hypoxia-responsiveness of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 in mammary gland malignant cell lines. *Acta Biochim. Pol.*, 2005; 52: 881-888
- [55] Moreno-Sanchez R., Rodriguez-Enriquez S., Marin-Hernandez A., Saavedra E.: Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.*, 2007; 274: 1393-1418
- [56] Navarro-Sabate A., Manzano A., Riera L., Rosa J.L., Ventura F., Bartrons R.: The human ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene (PFKFB3): Promoter characterization and genomic structure. *Gene.*, 2001; 264: 131-138
- [57] Novellasdemunt L., Bultot L., Manzano A., Ventura F., Rosa J.L., Vertommen D., Rider M.H., Navarro-Sabate A., Bartrons R.: PFKFB3 activation in cancer cells by the p38/MK2 pathway in response to stress stimuli. *Biochem. J.*, 2013; 452: 531-543
- [58] Novellasdemunt L., Obach M., Millan-Arino L., Manzano A., Ventura F., Rosa J.L., Jordan A., Navarro-Sabate A., Bartrons R.: Progesterins activate 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3 (PFKFB3) in breast cancer cells. *Biochem. J.*, 2012; 442: 345-356
- [59] Obach M., Navarro-Sabate A., Caro J., Kong X., Duran J., Gomez M., Perales J.C., Ventura F., Rosa J.L., Bartrons R.: 6-Phosphofructo-2-kinase (*pfkfb3*) gene promoter contains hypoxia-inducible factor-1 binding sites necessary for transactivation in response to hypoxia. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 53562-53570
- [60] Okar D.A., Lange A.J.: Fructose-2,6-bisphosphate and control of carbohydrate metabolism in eukaryotes. *Biofactors*, 1999; 10: 1-14
- [61] Okar D.A., Manzano A., Navarro-Sabate A., Riera L., Bartrons R., Lange A.J.: PFK-2/FBPase-2: Maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends Biochem. Sci.*, 2001; 26: 30-35
- [62] Osthus R.C., Shim H., Kim S., Li Q., Reddy R., Mukherjee M., Xu Y., Wonsey D., Lee L.A., Dang C.V.: Dereglulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 21797-21800
- [63] Peet A., Lieberman M.A., Marks A.: Marks' Basic Medical Biochemistry. A Clinical Approach, 2005; p.897
- [64] Pilkis S.J., Claus T.H., Kurland I.J., Lange A.J.: 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: A metabolic signaling enzyme. *Annu. Rev. Biochem.*, 1995; 64: 799-835
- [65] Pilkis S.J., el-Maghrabi M.R., Claus T.H.: Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Biochem.*, 1998; 57: 755-783
- [66] Pilkis S.J., Fox E., Wolfe L., Rothbarth L., Colosia A., Stewart H.B., el-Maghrabi M.R.: Hormonal modulation of key hepatic regulatory enzymes in the gluconeogenic/glycolytic pathway. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 1986; 478: 1-19
- [67] Raffaghello L., Lee C., Safdie F.M., Wei M., Madia F., Bianchi G., Longo V.D.: Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 8215-8220
- [68] Rider M.H., Bertrand L., Vertommen D., Michels P.A., Rousseau G.G., Hue L.: 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochem. J.*, 2004; 381: 561-579
- [69] Rider M.H., van Damme J., Vertommen D., Michel A., Vandekerckhove J., Hue L.: Evidence for new phosphorylation sites for protein kinase C and cyclic AMP-dependent protein kinase in bovine heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *FEBS Lett.*, 1992; 310: 139-142
- [70] Rodriguez-Enriquez S., Juarez O., Rodriguez-Zavala J.S., Moreno-Sanchez R.: Multisite control of the Crabtree effect in ascites hepatoma cells. *Eur. J. Biochem.*, 2001; 268: 2512-2519
- [71] Ros S., Santos C.R., Moco S., Baenke F., Kelly G., Howell M., Zamboni N., Schulze A.: Functional metabolic screen identifies 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 as an important regulator of prostate cancer cell survival. *Cancer Discov.*, 2012; 2: 328-343
- [72] Ros S., Schulze A.: Balancing glycolytic flux: the role of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatases in cancer metabolism. *Cancer Metab.*, 2013; 1: 8
- [73] Schafer Z.T., Grassian A.R., Song L., Jiang Z., Gerhart-Hines Z., Irie H.Y., Gao S., Puigserver P., Brugge J.S.: Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment. *Nature*, 2009; 461: 109-113
- [74] Semenza G.L.: HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J. Clin. Invest.*, 2013; 123: 3664-3671
- [75] Semenza G.L.: Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci. STKE*, 2007; 407: cm8
- [76] Seo M., Lee Y.H.: PFKFB3 regulates oxidative stress homeostasis via its S-glutathionylation in cancer. *J. Mol. Biol.*, 2014; 426: 830-842
- [77] 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
- [78] Shim H., Lewis B.C., Dolde C., Li Q., Wu C.S., Chun Y.S., Dang C.V.: Myc target genes in neoplastic transformation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1997; 224: 181-190
- [79] Soga T.: Cancer metabolism: Key players in metabolic repro-

gramming. *Cancer Sci.*, 2013; 104: 275-281

[80] Sola-Penna M., Da Silva D., Coelho W.S., Marinho-Carvalho M.M., Zancan P.: Regulation of mammalian muscle type 6-phosphofructo-1-kinase and its implication for the control of the metabolism. *IUBMB Life.*, 2010; 62: 791-796

[81] Song M.S., Carracedo A., Salmena L., Song S.J., Egia A., Malumbres M., Pandolfi P.P.: Nuclear PTEN regulates the APC-CDH1 tumor-suppressive complex in a phosphatase-independent manner. *Cell*, 2011; 144: 187-199

[82] Telang S., Yalcin A., Clem A.L., Bucala R., Lane A.N., Eaton J.W., Chesney J.: *Ras* transformation requires metabolic control by 6-phosphofructo-2-kinase. *Oncogene*, 2006; 25: 7225-7234

[83] Uyeda K., Furuya E., Luby L.J.: The effect of natural and synthetic D-fructose 2,6-bisphosphate on the regulatory kinetic properties of liver and muscle phosphofructokinases. *J. Biol. Chem.*, 1981; 256: 8394-8399

[84] Van Schaftingen E.: Fructose 2,6-bisphosphate. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 1987; 59: 315-395

[85] Van Schaftingen E., Hue L., Hers H.G.: Fructose 2,6-bisphosphate, the probably structure of the glucose- and glucagon-sensitive stimulator of phosphofructokinase. *Biochem. J.*, 1980; 192: 897-901

[86] Vander Heiden M.G., Cantley L.C., Thompson C.B.: Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 2009; 324: 1029-1033

[87] Vaughn A.E., Deshmukh M.: Glucose metabolism inhibits apoptosis in neurons and cancer cells by redox inactivation of cytochrome c. *Nat. Cell. Biol.*, 2008; 10: 1477-1483

[88] Veech R.L., Lawson J.W., Cornell N.W., Krebs H.A.: Cytosolic phosphorylation potential. *J. Biol. Chem.*, 1979; 254: 6538-6547

[89] Walenta S., Salameh A., Lyng H., Evensen J.F., Mitze M., Rofstad E.K., Mueller-Klieser W.: Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with incidence of metastasis. *Am. J. Pathol.*, 1997; 150: 409-415

[90] Walenta S., Wetterling M., Lehrke M., Schwickert G., Sundfor K., Rofstad E.K., Mueller-Klieser W.: High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res.*, 2000; 60: 916-921

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

[92] Warburg O., Wind F., Negelein E.: The metabolism of tumors in the body. *J. Gen. Physiol.*, 1927; 8: 519-530

[93] Wu C., Khan S.A., Peng L.J., Lange A.J.: Roles for fructose-2,6-bisphosphate in the control of fuel metabolism: beyond its allosteric effects on glycolytic and gluconeogenic enzymes. *Adv. Enzyme Regul.*, 2006; 46: 72-88

[94] Yalcin A., Clem B.F., Imbert-Fernandez Y., Ozcan S.C., Peker S., O'Neal J., Klarer A.C., Clem A.L., Telang S., Chesney J.: 6-Phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) promotes cell cycle progression and suppresses apoptosis via Cdk1-mediated phosphorylation of p27. *Cell Death Dis.*, 2014; 5: e1337

[95] Yalcin A., Clem B.F., Simmons A., Lane A., Nelson K., Clem A.L., Brock E., Siow D., Wattenberg B., Telang S., Chesney J.: Nuclear targeting of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) increases proliferation via cyclin-dependent kinases. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 24223-24232

[96] Yalcin A., Telang S., Clem B., Chesney J.: Regulation of glucose metabolism by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases in cancer. *Exp. Mol. Pathol.*, 2009; 86: 174-179

[97] Yamamoto T., Takano N., Ishiwata K., Ohmura M., Nagahata Y., Matsuura T., Kamata A., Sakamoto K., Nakanishi T., Kubo A., Hishiki T., Suematsu M.: Reduced methylation of PFKFB3 in cancer cells shunts glucose towards the pentose phosphate pathway. *Nat. Commun.*, 2014; 5: 3480

[98] Yecies J.L., Manning B.D.: mTOR links oncogenic signaling to tumor cell metabolism. *J. Mol. Med.*, 2011; 89: 221-228

[99] Yecies J.L., Manning B.D.: Transcriptional control of cellular metabolism by mTOR signaling. *Cancer Res.*, 2011; 71: 2815-2820

[100] Yun S.J., Jo S.W., Ha Y.S., Lee O.J., Kim W.T., Kim Y.J., Lee S.C., Kim W.J.: *PFKFB4* as a prognostic marker in non-muscle-invasive bladder cancer. *Urol. Oncol.*, 2012; 30: 893-899

[101] Zhang J., Yao Y.H., Li B.G., Yang Q., Zhang P.Y., Wang H.T.: Prognostic value of pretreatment serum lactate dehydrogenase level in patients with solid tumors: A systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.*, 2015; 5: 9800

[102] Zhong H., De Marzo A.M., Laughner E., Lim M., Hilton D.A., Zagzag D., Buechler P., Isaacs W.B., Semenza G.L., Simons J.W.: Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.*, 1999; 59: 5830-5835

[103] Zu X.L., Guppy M.: Cancer metabolism: Facts, fantasy, and fiction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004; 313: 459-465

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.