Ankara Ecz. Fak. Derg. / J. Fac. Pharm. Ankara, 46(1): 182-192, 2022
Doi: 10.33483/jfpau.978805

DERLEME MAKALE / REVIEW ARTICLE

GENİŞ SPEKTRUMLU ANTİKANSER BİLEŞİKLER GELİŞTİRMEYE YÖNELİK POTANSİYEL BİR HEDEF: HEKSOKİNAZ-II

A POTENTIAL TARGET FOR DEVOLOPING BROAD SPECTRUM ANTICANCERS: HEXOKINASE-II

Mevlüt AKDAĞ[1*], Azime Berna ÖZÇELİK[1]

[1]Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 06330, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: *Kanser hücrelerinin glikoza duydukları ihtiyaç sonucu solunumla ilgili metabolik yolaklarını yeniden düzenlemesi, kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran önemli değişimlerden biridir ve bu değişim ilk olarak 1920'li yıllarda Otto Warburg tarafından rapor edildiği için "Warburg Fenomeni" olarak bilinir. Kanser hücrelerindeki artmış glikoliz, bu yolağı önemli bir kanser hedefi haline getirir. Glikolizin ilk ve hız kısıtlayıcı basamaklarından biri olan Heksokinaz (HK) enzimi bu açıdan önemli bir hedeftir ve kanser hücrelerinde karşımıza çıkan HK-II'nin baskın olduğu fenotip bu izozime yönelik tedavilerin geliştirilmesini mümkün kılar. Medisinal kimya yaklaşımları kullanılarak bu izozime karşı selektivite sağlayan heterosiklik yapılar ve fonksiyonel gruplar belirlenerek yeni inhibitörler dizayn edilebilir.*

Sonuç ve Tartışma: *HK-II'ye yönelik selektif tedaviler enzimin inhibisyonunu, regülasyonunu ve ekspresyonunu temel alır. HK-II'yi hedef alan küçük moleküller yeni moleküllerin keşfi için bir temel oluşturmaktadır. HK-II'ye selektif inhibitörlerin keşfi, kansere yönelik spesifik ve geniş spektrumlu ajanların gelecekte tedavide yer alabilmesi bakımından umut verici bir gelişmedir.*

Anahtar Kelimeler: *Glikoliz, heksokinaz, kanser, kemoterapi, Warburg Etkisi*

ABSTRACT

Objective: *As a result of increased need of glucose, reprogramming the metabolic pathways related to respiration is a significant change in cancer cells which differs them from normal cells and this change is known as "Warburg Phenomenon" because firstly reported by Otto Warburg in 1920s. Increased glycolysis in cancer cells makes glycolysis pathway an important target for cancer tratment. Hexokinase (HK), first and one of the rate limiting steps of glycolitic pathway, is an important target through this perspective since the prominent phenotype in cancer cells is HK-II, this makes the development of new therapies against this isozyme possible. Using medicinal chemistry approaches new inhibitors can be designed by determining the heterocycles and functional groups providing selectivity against this isozyme.*

[*] **Sorumlu Yazar / Corresponding Author:** Mevlüt Akdağ
e-posta / e-mail: mevakda@gmail.com, **Tel. / Phone:** +905053499305

Gönderilme / Submitted: 04.08.2021 **Kabul / Accepted:** 01.10.2021

Result and Discussion: *Selective therapies against HK-II are based on inhibition, regulation, and expression of this enzyme. Small molecules targeting HK-II provide a basis for developing novel molecules. The discovery of selective inhibitors of HK-II is a promising progress for using selective and wide spectrum agents against cancer in the future cancer therapy.*

Keywords: *Cancer, chemotherapy, glycolysis, hexokinase, Warburg Effect*

GİRİŞ

Kanser gelişimi mutasyonlardan ve epigenetik faktörlerden köken alan karmaşık bir süreçtir [1]. Bugüne kadar malignitelerin tedavisi için birçok ilaç geliştirilmiş olsa da kanserin karmaşık doğasından ötürü geliştirilen tedaviler hala yetersizdir [2].

Hücre içindeki metabolik faaliyetler enzim denilen biyolojik katalizörlerle gerçekleştirilir. Bu katalizörlerin hücre içindeki miktarının ya da etkinliğinin artması veya azalması kanser gibi bazı patolojilerle ilişkilendirilebilir ve bu da bu enzimatik yolakları hastalıkların tedavisi için bir hedef haline getirir [3]. Hücre metabolizmasının yeniden düzenlenmesi kanser hücrelerinin ayırt edici özelliklerinden biridir [4].

Kanser hücrelerindeki solunumla ilgili metabolik değişiklikler 1920'li yıllarda Otto Warburg tarafından ortaya konulmuştur ve uzun zamandır "Warburg fenomeni" olarak bilinmektedir. [5,6,7]. Kanser hücrelerinin aerobik şartlarda bile hücreye fazlaca glikoz alıp, oksidatif fosforilasyona göre daha az enerji sağlayan glikoliz yolağını kullanarak enerji elde etmesi, kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran bir özelliktir. Bu ayırt edici özellik, kanser hücrelerinin bir glikoz analoğu olan florodeoksiglikoz ile işaretlenmesini ve pozitron emisyon tomografisi ile tespit edilmesini sağlar [7].

Glikozun fosforilasyonunu sağlayan HK enziminin bazı izozimlerinin tümörlerde ekspresyonunun artması, regülasyonu ve lokalizasyonu tümör hücreleri için hayli avantajlı bir durum sağlamaktadır. Bu sebeple de bu enzim, kansere karşı ilaç geliştirme çalışmaları için ideal bir hedef olabilir [8]. Bu enzimi hedef alan küçük moleküller mevcuttur.

Kanser Hücrelerinde Glikoliz

Normal memeli hücrelerinde enerji üretimi temelde iki yolla olmaktadır; laktik asit fermantasyonu ve aerobik solunum. Laktik asit fermantasyonu sitozolde gerçekleşir ve evrensel bir metabolik yolak olan glikoliz ile glikoz pürivata kadar parçalanır. Pürivat sonrasında laktata indirgenir ve kan dolaşımına geçer. Aerobik solunumda ise glikolizi takiben krebs döngüsü ve oksidatif fosforilasyon reaksiyonları mitokondri içerisinde gerçekleşir. Burada substratlar CO_2 ve H_2O'ya kadar parçalanır ve enerji üretimi çok daha fazladır [9].

Kanser metabolizması ve Warburg etkisi için fosfoinositid 3-kinaz/protein kinaz B/rapamisinin memeli hedefi (PI3K/Akt/mTOR) ve hipoksi ile indüklenebilen faktör-1 (HIF-1), önemli düzenleyici mekanizmalar olarak karşımıza çıkar. PI3K yolağının Akt üzerinden glikoz taşıyıcısı ekspresyonunu (GLUT-1) artırdığı gösterilmiş ve hücreye fazla miktarda glikoz girişi ile bu yolağın aktivasyonu

ilişkilendirilmiştir. Tümör büyüdükçe hipoksik stres artar ve yeni kan damarlarına duyulan ihtiyaç da artar. HIF-1 ise normoksi şartlarında stabil olmayan alt ünitelerden oluşmuştur ve hipoksi koşullarında koaktivatör proteinler tarafından stabilize edilerek anjiyogenezi uyarır. Bu da dolaylı olarak ya da doğrudan artan glikoz alımı ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca tümör hücrelerinde HK enzimi düzeyleri, HIF-1 aktivasyonu ile artabilmektedir [10, 11].

Warburg etkisi olarak bilinen, aslında sadece kanser hücrelerinin değil tüm çoğalan hücrelerin ortak bir metabolik değişimi olarak sayılabilecek fenomen, bölünen hücrelerin temel komponentlerinin sentezi için gerekli prokürsörlere duyduğu ihtiyaçla; yani bölünen hücreler tarafından sürekli bir karbon kaynağına duyulan gereksinimle açıklanabilir. Sürekli bölünen hücrelerde lipitler, aminoasitler ve nükleotitler gibi yapı maddelerine büyük bir ihtiyaç vardır. Bu nedenle de kanser hücreleri glikozu tamamen parçalayarak enerji elde etmek yerine aynı zamanda gerekli karbon kaynaklarını sağlayarak bazı yapı maddelerini sentezler. Bu da kanser hücrelerindeki artmış glikolizi kısmen açıklamaktadır [12].

HK Enzimi ve Kanser

Glikoz hücreye GLUT'lar ile taşınır. HK GLUT'lar aracılığıyla taşınan glikozun glikoz-6-fosfata (G6P) dönüşümünü katalizleyen enzimdir ve 4 önemli izozimden oluşur; bunlar HK-I, HK-II, HK-III ve HK-IV (glukokinaz) veya A, B, C ve D'dir. Bunlar arasında çoğu tümörde Warburg fenotipinin görülmesini sağlayan HK-II'dir. HK-II başlıca adipoz dokuda ve iskelet kaslarında bulunur [13]. HK-I, II ve III'ün glikoza olan affinitesi IV'e göre daha yüksektir [8]. HK-IV eksprese eden normal hücrelerde, tümör gelişimi sırasında HK-IV ekspresyonunun susturulduğu ve HK-II ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir [14].

1960'larda yapılan çalışmalarda HK-I ve II'nin mitokondri dış membranına bağlandığı bulunmuştur. HK-II, mitokondriyal dış membran proteini olan voltaj bağımlı anyon kanalı 1'e (VDAC1) bağlanır. VDAC1, adenozin nükleotit translokaz (ANT) ile etkileşim halindedir ve böylelikle mitokondriyal iç ve dış zar arasında bir bağlantı oluşturur. Mitokondriye bağlı HK'ler, glikoliz ve oksidatif fosforilasyon arasındaki bağlantıyı kolaylaştırırlar ve mitokondri tarafından üretilen ATP'ye HK'lerin erişiminde bu durum bir avantajdır. Aynı zamanda HK'lerin katalitik aktivitesi sonucu üretilen ADP'de tekrar fosforilasyon için mitokondriye yönlendirilerek metabolik bir avantaj kazanılır. Fakat bunların yanında mitokondri-HK ilişkisi apoptotik yolakları düzenleyen önemli bir komponenttir. Major bir mitokondriyal ölüm yolağı, Bcl-2 ailesine ait Bak ve Bax gibi proteinlerle ve mitokondriyal permeabilite geçiş poruyla (mitokondri iç zarında oluşan büyük bir kanal-mPTP) ilişkilidir. Aktive Bak/Bax, mitokondri dış zarında apoptotik faktörlerin membranlar arası boşluktan sızmasını sağlayan bir por oluşturur. Mitokondri ilişkili HK-II, Bcl-2 ailesine ait proteinleri antagonize ederek hücreyi apoptotik uyarıdan korur. Mitokondri ilişkili HK-II, Bax'ın mitokondriye bağlanmasını yarışmalı olarak inhibe eder ve ayrıca kesilmiş Bid (tBid) ile indüklenmiş Bax/Bak aracılı apoptozisi antagonize eder.

mPTP'nin açılması ise mitokondri iç zarından dış zarına Ca^{+2} iyonlarının geçişiyle sonuçlanır ve dış zarın hasar görmesiyle de hücre nekroza gider. Mitokondri ilişkili HK-II'nin, mPTP açılmasını inhibe ettiği rapor edilmiştir [8, 14, 15].

VDAC stabilizasyonunun bozulmasının reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırdığı görülmüştür. HK-II'nin antiapoptotik etkileri VDAC konfigürasyonunu stabilize etmesiyle ilişkilidir [16].

Besin bolluğunun bulunduğu şartlar altında, rafampisin hedefi kompleks-1 (mTORC1) hücre büyümesini desteklemekte ve otofajiyi durdurmaktadır. Tan ve ark. tarafından glikoz miktarının azaldığı durumlarda HK-II'nin otofajiyi direkt mTORC1 aktivitesini inhibe ederek indüklediği gösterilmiştir [17].

Min ve ark. tarafından, inositol polifosfat 4-fosfataz tip 2 (INPP4B) ve HK-II seviyelerinin azalmasının radyorezistan-gırtlak kanseri hücrelerinde radyoterapiye duyarlılığı artırdığı gözlemlenmiştir. INPP4B, Akt-mTOR yolağı üzerinden HK-II'yi indüklemekte ve aerobik glikolizi düzenlemektedir [18].

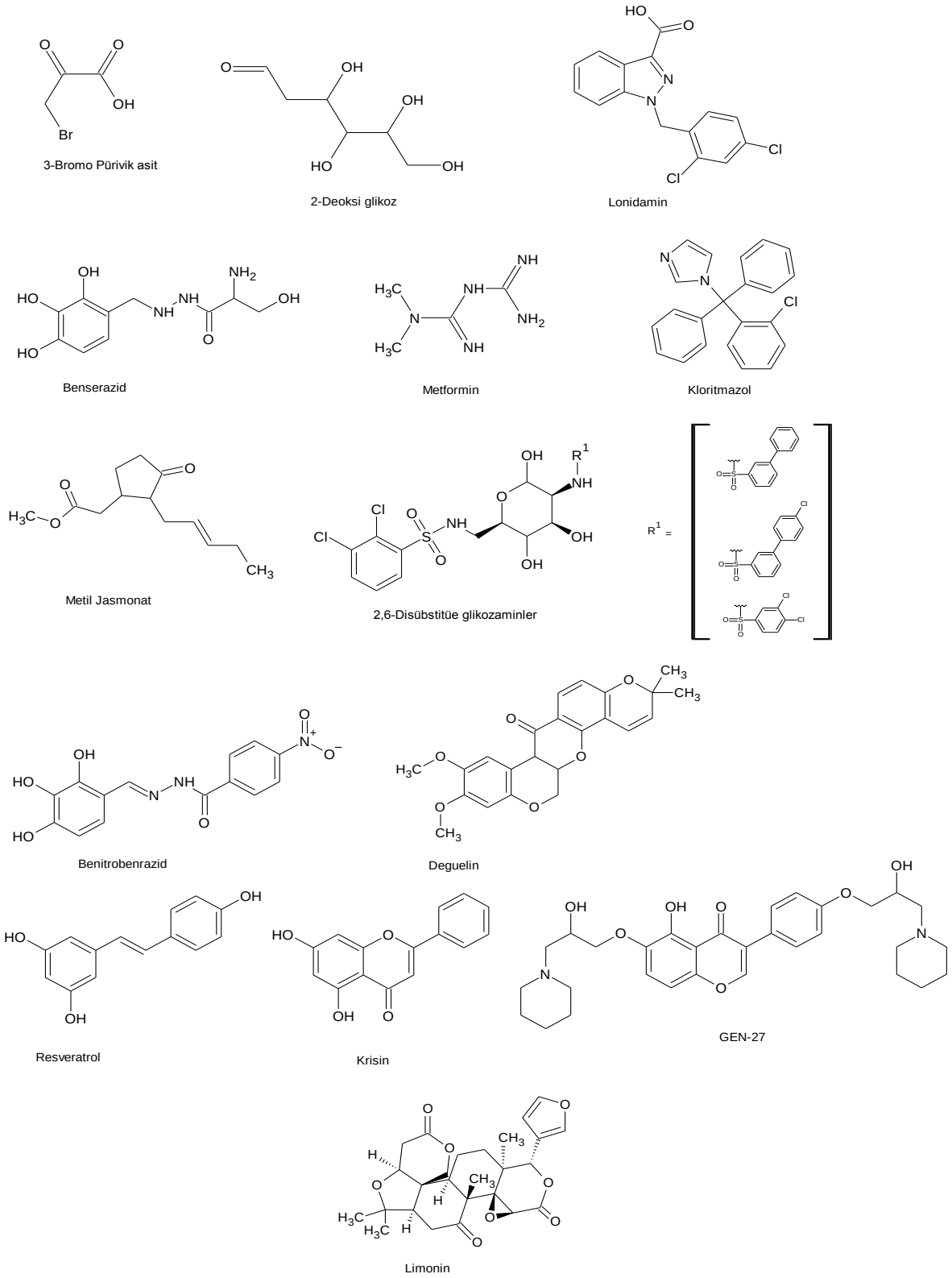
HK-II Enzimini Hedef Alan Moleküller

Kanser hücrelerinde baskın izozim HK-II olduğu için HK-II selektif bileşiklerin geliştirilmesi önem arz etmektedir. Enzimin aktif yöresinin oldukça polar olmasından ve enzimin karmaşık fonksiyonlarından dolayı ilaç geliştirme çalışmaları için zorlu bir hedeftir. Lin ve ark. tarafından HK-II için kristalografi çalışmaları yapılmış ve HK-II'ye ait ligand bağlı ko-kristal yapısı incelenmiştir [19].

Kanser için bir hedef olarak düşünüldüğünde; HK-II sentezinin direkt olarak inhibisyonu, katalitik faaliyetlerinin inhibisyonu ya da HK-VDAC etkileşiminin inhibisyonu, üzerinde durulması gereken stratejiler olarak karşımıza çıkmaktadır [8].

siRNA, genleri susturmak ve işlevlerini anlamak için kullanılmaktadır. HK-II ekspresyonunun siRNA kullanılarak susturulması; hücre döngüsünün G1 fazında kalmasına, glikoz metabolizmasının azalmasına ve tümör oluşumunun inhibisyonuna yol açmıştır [20, 21]. Bunun dışında HK enzimini hedef alan küçük moleküller, sentetik moleküller tasarlamak için iyi bir başlangıç noktası sağlayabilir.

Bir pürivat türevi olan 3-bromopürivik asit (3-BP) (Şekil 1) hücreye mono karboksilat taşıyıcıları (MCTs) ile girer. 3-BP'nin çok çeşitli hedefleri vardır ve bir alkilatör olması sebebiyle çok çeşitli makromolekülleri etkilemesi beklenen bir durumdur. *İn vivo* etkinliğini, glikolitik yolakları, mitokondriyal hedefleri ve tümör mikro çevresini etkileyerek açığa çıkardığı düşünülmektedir [22, 23]. Chen ve ark. tarafından 3-BP'nin, HK-II'de yaptığı kovalent modifikasyonlarla mitokondri/HK-II ayrışmasına sebep olduğu ve bu sayede de apoptotik faktörlerin salınımının gerçekleştiği rapor edilmiştir [24]. Ko ve ark. tarafından 3-BP'nin bir HK inhibitörü olduğu [25] ve yine başka bir çalışmada Ko ve ark. tarafından 3-BP'nin normal hücreler üzerinde önemli bir toksisite göstermeden hepatoselüler karsinomada *in vivo* etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir [26].



Şekil 1. Heksokinaz enzimini hedef alan küçük moleküller

2-Deoksiglikoz (2-DG) (Şekil 1), glikozun ikinci karbonundaki hidroksil grubunun yerine bir hidrojenin geldiği glikoz analoğudur ve HK tarafından fosforillenir fakat 2-DG-fosfat ileri metabolizmaya uğramaz. Böylelikle de biriken fosforillenmiş ürün HK'yı inhibe eder ve dolayısıyla da glikolizi inhibe etmiş olur. Ayrıca 2-DG kan beyin bariyerini geçebilir ve birçok klinik çalışmaya girmiştir [27]. Cheng ve ark. yaptıkları çalışmada mitokondriyi hedefleyen ilaçlarla 2-DG'nin kombine kullanımının meme kanseri hücrelerine karşı sinerjik etki oluşturduğunu rapor etmiştir [28].

İlk olarak antispermatojenik ajan olarak tanıtılmış bir indazol-3-karboksilik asit türevi olan lonidamin (LND) (Şekil 1), tek başına kullanıldığında önemli bir antineoplastik aktivite göstermeyen fakat alkilleyici ajanlar gibi konvansiyonel ilaçlarla ve vemurafenib gibi hedeflenmiş ilaçlarla kombine kullanıldığında bu ilaçların etkinliğini artıran bir ajandır. LND, mitokondriye bağlı heksokinazı inaktive eder ve apoptozu tetiklediğine dair kanıtlar vardır. Ayrıca normal hücreler üzerinde etkisi çok azdır ve sadece bir etki mekanizması üzerinden etki göstermez [29]. LND'nin tek başına antineoplastik etkisinin zayıf olması ve platinlerin etkinliğini artırması göz önüne alınarak, Chen ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, LND konjuge edilmiş beş tane Pt(IV) türevi sentezlenmiş ve $[Pt(NH_3)_2(LND)Cl_3]$ bileşiğinin *in vitro* olarak cis-platin rezistansını engelleme potansiyeline sahip olduğu rapor edilmiştir [30].

Bir karbohidrazit olan benserazid (BNZ) (Şekil 1), farmakokinetik özellikleri ve toksisitesi iyi bilinen bir dopadekarboksilaz inhibitörü ilaçtır. Li ve ark. yaptığı bir çalışmada sanal tarama yöntemi ile BNZ'yi bir HK inhibitörü olarak bulmuştur. Yine aynı araştırma grubu tarafından yapılan *in vitro* çalışmalarda BNZ'nin selektif bir HK-II inhibitörü olduğu gösterilmiş ve *in vivo* çalışmalarla da tümörlü farelerde tümör büyümesinin baskılandığı bildirilmiştir. Lider bileşik olarak benserazid temel alınıp, HK-II selektif inhibitörleri olan BNZ analogları tasarlanabileceği bildirilmiştir [31].

Bir guanidin sınıfı antidiyabetik olan metformin (Şekil 1), antihiperglisemik etkilerinin yanında antikanser etkilere de sahip olduğu gösterilmiş bir ajandır. Salani ve ark. yaptığı bir çalışmada, Calu-1 hücrelerinde metforminin HK-II enzimini inhibe ettiğini ve mitokondri-HK ayrışmasını sağladığını göstermişlerdir. Yapılan *in silico* çalışmalara göre, metforminin inhibe edici etkisini, HK-II'nin bağlanma bölgesinde G6P'yı taklit etmesiyle ilişkilendirmişlerdir [32].

Bir imidazol türevi antifungal olan kloritmazol (Şekil 1) klinikte 20 seneden fazla süredir kullanılmaktadır. Adinolfi ve ark. yaptıkları bir çalışmada kloritmazolün A375 insan melanom hücrelerindeki antikanser etkilerini incelemişlerdir ve bu bileşiğin HK-II ekspresyonunu azalttığını rapor etmişlerdir [33].

Bitki stres hormonları olan jasmonatlar, antikanser etkileri bulunan küçük hidrofobik moleküllerdir. Jasmonatların moleküler hedeflerinin incelendiği bir çalışmada Goldin ve ark. metil jasmonatın (Şekil 1) HK-I ve II'ye bağlanıp mitokondri-HK ayrışmasını sağladığını göstermişlerdir. 4 ayrı kanser tipine karşı (murin melanom B16, murin kolon karsinom CT26, murin B hücre lösemi BCL1,

insan T lenfoblastik lösemi hüce hattı Molt-4) metil jasmonat etkili bulunmuş ve geniş spektrumlu bir antikanser ajan olarak etkili olabileceği gösterilmiştir [34].

Lin ve ark. yüksek çıktılı tarama (high throughput screen) sonucunda bir glikoz amin türevi bileşiği zayıf HK-II inhibitörü olarak bulmuşlardır ve yaptıkları kristalografi ve yapı etki ilişkileri çalışmaları sonucunda 2,6-disübstitüe glikoz amin türevlerini (Şekil 1) selektif HK-II inhibitörleri olarak rapor etmişlerdir [19].

Liu ve ark. yaptıkları bir çalışmada 6 milyondan fazla bileşiği sanal tarama yöntemiyle taramışlar ve (*E*)-N'(2,3,4-trihidroksibenziliden)arilhidrazid yapısını iskelet olarak belirlemişlerdir. Sonrasında 26 tane (*E*)-N'(2,3,4-trihidroksibenziliden)arilhidrazid yapısındaki bileşiği sentezlemiş, HK-II aktivitesini incelemiş ve insan kolon kanseri hücreleri SW840 ve insan pankreas kanseri hücreleri SW1990 hattına karşı etkisini incelemişlerdir. Daha sonra benitrobenrazid (BNBZ) ((E)-4-nitro-N′-(2,3,4-trihidroksibenziliden)benzohidrazid) (Şekil 1) olarak adlandırılan lider bileşiğin HK-II aktivitesi IC_{50} = 0.53 ± 0.13 μM olarak belirlenmiş ve bu bileşik SW840 hücrelerine karşı IC_{50} = 7.13 ± 1.12 μM seviyede büyüme inhibisyonu göstermiştir [35]. Daha sonra, Zheng ve ark. yaptıkları çalışmada, BNBZ'nin HK-II ye karşı selektif bir inhbitör olduğunu ve HK-II geninin işlevsiz hale getirildiği (HK-II knockout ve knockdown) hücrelerde BNBZ etkinliğinin azaldığını göstermişlerdir [36].

Yukarıda özetlenen ajanların dışında HK-II enziminin ekspresyonunu ve işlevini etkileyen birçok molekül rapor edilmiştir. Li ve ark. deguelinin (Şekil 1) küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) hücrelerinde HK-II ekspresyonunu azalttığını [37], yine Li ve ark. yaptığı bir çalışmada resveratrolün (Şekil 1) NSCLC hücrelerinde HK-II ekspresyonunu azalttığını [38], Xu ve ark. yaptıkları bir çalışmada krisinin (Şekil 1) hepatosellüler karsinomada (HCC) HK-II ekspresyonunu azaltarak tümör glikolizini inhibe ettiğini [39], Tao ve ark. sentetik bir flavonoid olan GEN-27'nin (Şekil 1) insan meme kanseri hücrelerinde HK-II ekspresyonunu azalttığını [40], Yao ve ark. limoninin (Şekil 1) HK-II/mitokondri ayrışmasını sağlayarak HCC proliferasyonu ve kolonizasyonunu *in vitro* olarak inhibe etiğini [41] rapor etmişlerdir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

HK, glikolizin ilk basamağında glikozu substrat olarak kullanan ve enerji eldesi için glikozu metabolik değişime uğratan bir enzimdir. HK'lar arasında kanser hücrelerinde baskın izozimin HK-II olması kanser hücrelerine karşı selektif moleküllerin geliştirilebilmesine imkan veren ayırt edici özellikte bir fenotip değişimidir. Kanser hücrelerindeki solunumla ilgili metabolik değişimlerin hedeflenmesi, geniş spektrumlu antikanser ajanların elde edilebilmesi açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle de HK-II enzimini hedef alan tedavilerin geliştirilmesi kanser kemoterapisindeki başarıyı artırmaya yönelik önemli gelişmeler elde edilmesini sağlayabilir. Bu bağlamda da enzimin ligand bağlı

ko-kristalinin ve mevcut inhibitörlerinin literatürde rapor edilmiş olması ilaç geliştirme çalışmalarını hızlandıracak ve araştırmacılara yol gösterecek önemli gelişmelerdir.

YAZAR KATKILARI

Kavram: *M.A., A.B.Ö.;* Tasarım: *M.A., A.B.Ö.*; Denetim: *M.A., A.B.Ö.*; Kaynaklar: *M.A., A.B.Ö.*; Malzemeler: -; Veri toplama ve/veya işleme: *M.A., A.B.Ö.*; Analiz ve/veya yorumlama: *M.A., A.B.Ö.*; Literatür taraması: *M.A., A.B.Ö.*; Makalenin yazılması: *M.A., A.B.Ö.*; Kritik inceleme: *M.A., A.B.Ö.*; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

1. Pirastehzad, A., Taghizadeh, A., Jamshidi, A.A. (2020). The formation of cancer stem cells in EMT6/Ro tumor: Hybrid modeling within its micro-environment. *Informatics in Medicine Unlocked*, *18*, 100247. [CrossRef]

2. Valkenburg, K.C., de Groot, A.E., Pienta, K.J. (2018). Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *15*(6), 366-381. [CrossRef]

3. Hemalatha, T., UmaMaheswari, T., Krithiga, G., Sankaranarayanan, P., Puvanakrishnan, R. (2013). Enzymes in clinical medicine: an overview. *Indian Journal of Experimental Biology*, *51*(10), 777-788.

4. Bobrovnikova-Marjon, E., Hurov, J.B. (2014). Targeting metabolic changes in cancer: novel therapeutic approaches. *Annual Review of Medicine*, *65*, 157-170. [CrossRef]

5. Warburg, O., Wind, F., Negelein, E. (1927). The metabolism of tumors in the body. *The Journal of General Physiology*, *8*(6), 519-530. [CrossRef]

6. Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, *123*(3191), 309-314. [CrossRef]

7. Hundshammer, C., Braeuer, M., Müller, C.A., Hansen, A.E., Schillmaier, M., Düwel, S., Feuerecker, B., Glaser, S.J., Haase, A., Weicherd, W., Steiger, K., Cabello, J., Schilling, F., Hövener, J., Kjaer, A., Nekolla, S.G., Schwaiger, M. (2018). Simultaneous characterization of tumor cellularity and the Warburg effect with PET, MRI and hyperpolarized 13C-MRSI. *Theranostics*, *8*(17), 4765. [CrossRef]

8. Mathupala, S.P., Ko, Y.A., Pedersen, P.L. (2006). Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene*, *25*(34), 4777-4786. [CrossRef]

9. Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. (2005). Lehninger Principles of Biochemistry, New York: W.H. Freeman.

10. Courtnay, R., Ngo, D.C., Malik, N., Ververis, K., Tortorella, S.M., Karagiannis, T.C. (2015). Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. *Molecular Biology Reports*, *42*(4), 841-851. [CrossRef]

11. Kaelin Jr, W.G., Ratcliffe, P.J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular Cell*, *30*(4), 393-402. [CrossRef]

12. Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, *324*(5930), 1029-1033. [CrossRef]

13. Gill, K.S., Fernandes, P., O'Donovan, T.R., McKenna, S.L., Doddakula, K.K., Power, D.G., Soden, D.M., Forde, P.F. (2016). Glycolysis inhibition as a cancer treatment and its role in an anti-tumour immune response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, *1866*(1), 87-105. [CrossRef]

14. Roberts, D.J., Miyamoto, S. (2015). Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Akting on mitochondria and TORCing to autophagy. *Cell Death & Differentiation*, *22*(2), 248-257. [CrossRef]

15. Miyamoto, S., Murphy, A. N., Brown, J. H. (2008). Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II. *Cell Death & Differentiation*, *15*(3), 521-529. [CrossRef]

16. Fruehauf, J.P., Meyskens, F.L. (2007). Reactive oxygen species: a breath of life or death?. *Clinical Cancer Research*, *13*(3), 789-794. [CrossRef]

17. Tan, V.P., Miyamoto, S. (2015). HK2/hexokinase-II integrates glycolysis and autophagy to confer cellular protection. *Autophagy*, *11*(6), 963-964. [CrossRef]

18. Min, J.W., Kim, K.I., Kim, H.A., Kim, E.K., Noh, W.C., Jeon, H.B., Cho D.H., Oh J.S., Park I.C., Hwang S.G., Kim, J.S. (2013). INPP4B-mediated tumor resistance is associated with modulation of glucose metabolism via hexokinase 2 regulation in laryngeal cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *440*(1), 137-142. [CrossRef]

19. Lin, H., Zeng, J., Xie, R., Schulz, M.J., Tedesco, R., Qu, J., Erhard, K.F., Mack, J.F., Raha, K., Rendina, A.R., Szewczuk, L.M., Kratz, P.M., Jurewicz, A.J., Cecconie, T., Martens, S., McDevitt, P.J., Martin, J.D., Chen, S.B., Jiang, Y., Nickels, L., Schwartz, B.J., Smallwood, A., Zhao, B., Campobasso, N., Qian, Y., Briand, J., Rominger, C.M., Oleykowski, C., Hardwicke, M.A., Luengo, J.I. (2016). Discovery of a novel 2, 6-disubstituted glucosamine series of potent and selective hexokinase 2 inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, *7*(3), 217-222. [CrossRef]

20. Hu, J.W., Sun, P., Zhang, D.X., Xiong, W.J., Mi, J. (2014). Hexokinase 2 regulates G1/S checkpoint through CDK2 in cancer-associated fibroblasts. *Cellular Signalling*, *26*(10), 2210-2216. [CrossRef]

21. Fang, R., Xiao, T., Fang, Z., Sun, Y., Li, F., Gao, Y., Feng, Y., Li, L., Wang, Y., Liu, X., Chen, H., Liu, X., Ji, H. (2012). MicroRNA-143 (miR-143) regulates cancer glycolysis via targeting hexokinase 2 gene. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(27), 23227-23235. [CrossRef]

22. Shoshan, M.C. (2012). 3-Bromopyruvate: targets and outcomes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *44*(1), 7-15. [CrossRef]

23. Queirós, O., Preto, A., Pacheco, A., Pinheiro, C., Azevedo-Silva, J., Moreira, R., Pedro, M., Ko, Y.H., Pendersen, P.L., Baltazar, F., Casal, M. (2012). Butyrate activates the monocarboxylate transporter MCT4 expression in breast cancer cells and enhances the antitumor activity of 3-bromopyruvate. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *44*(1), 141-153. [CrossRef]

24. Chen, Z., Zhang, H., Lu, W., Huang, P. (2009). Role of mitochondria-associated hexokinase II in cancer cell death induced by 3-bromopyruvate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1787*(5), 553-560. [CrossRef]

25. Ko, Y.H., Pedersen, P.L., Geschwind, J.F. (2001). Glucose catabolism in the rabbit VX2 tumor model for liver cancer: characterization and targeting hexokinase. *Cancer Letters*, *173*(1), 83-91. [CrossRef]

26. Ko, Y.H., Smith, B.L., Wang, Y., Pomper, M.G., Rini, D.A., Torbenson, M.S., Hullihen J., Pedersen, P.L. (2004). Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *324*(1), 269-275. [CrossRef]

27. Pruss, M., Dwucet, A., Tanriover, M., Hlavac, M., Kast, R.E., Debatin, K.M., Wirtz, C.R., Halatsch, M., Siegelin, M.D., Westhoff, M., Karpel-Massler, G. (2020). Dual metabolic reprogramming by ONC201/TIC10 and 2-Deoxyglucose induces energy depletion and synergistic anti-cancer activity in glioblastoma. *British Journal of Cancer*, *122*(8), 1146-1157. [CrossRef]

28. Cheng, G., Zielonka, J., Dranka, B.P., McAllister, D., Mackinnon, A.C., Joseph, J., Kalyanaraman, B. (2012). Mitochondria-targeted drugs synergize with 2-deoxyglucose to trigger breast cancer cell death. *Cancer Research*, *72*(10), 2634-2644. [CrossRef]

29. Nath, K., Guo, L., Nancolas, B., Nelson, D.S., Shestov, A.A., Lee, S.C., Roman, J., Zhou, R., Leeper, D.P., Halestrap, A.P., Blair, I.A., Glickson, J.D. (2016). Mechanism of antineoplastic activity of lonidamine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, *1866*(2), 151-162. [CrossRef]

30. Chen, H., Chen, F., Hu, W., Gou, S. (2018). Effective platinum (IV) prodrugs conjugated with lonidamine as a functional group working on the mitochondria. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *180*, 119-128. [CrossRef]

31. Li, W., Zheng, M., Wu, S., Gao, S., Yang, M., Li, Z., Min, Q., Sun, W., Chen, L., Xiang, G., Li, H. (2017). Benserazide, a dopadecarboxylase inhibitor, suppresses tumor growth by targeting hexokinase 2. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *36*(1), 1-12. [CrossRef]

32. Salani, B., Marini, C., Del Rio, A., Ravera, S., Massollo, M., Orengo, A.M., Amaro, A., Passalacqua, M., Maffioli, S., Pfeffer, U., Cordera, R., Maggi, D., Sambuceti, G. (2013). Metformin impairs glucose consumption and survival in Calu-1 cells by direct inhibition of hexokinase-II. *Scientific Reports*, *3*(1), 1-8. [CrossRef]

33. Adinolfi, B., Carpi, S., Romanini, A., Da Pozzo, E., Castagna, M., Costa, B., Martini, C., Olensen, S., Schmitt, N., Breschi, M.C., Nieri, P., Fogli, S. (2015). Analysis of the antitumor activity of clotrimazole on A375 human melanoma cells. *Anticancer Research*, *35*(7), 3781-3786.

34. Goldin, N., Arzoine, L., Heyfets, A., Israelson, A., Zaslavsky, Z., Bravman, T., Bronner, V., Notcovich, A., Shoshan-Barmatz, V., Flescher, E. (2008). Methyl jasmonate binds to and detaches mitochondria-bound hexokinase. *Oncogene*, *27*(34), 4636-4643. [CrossRef]

35. Liu, Y., Li, M., Zhang, Y., Wu, C., Yang, K., Gao, S., Zheng, M., Li, X., Li, H., Chen, L. (2020). Structure based discovery of novel hexokinase 2 inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, *96*, 103609. [CrossRef]

36. Zheng, M., Wu, C., Yang, K., Yang, Y., Liu, Y., Gao, S., Wang, Q., Li, C., Chen, L., Li, H. (2021). Novel selective hexokinase 2 inhibitor Benitrobenrazide blocks cancer cells growth by targeting glycolysis. *Pharmacological Research*, *164*, 105367. [CrossRef]

37. Li, W., Gao, F., Ma, X., Wang, R., Dong, X., Wang, W. (2017). Deguelin inhibits non-small cell lung cancer via down-regulating Hexokinases II-mediated glycolysis. *Oncotarget*, *8*(20), 32586. [CrossRef]

38. Li, W., Ma, X., Li, N., Liu, H., Dong, Q., Zhang, J., Yang, C., Liu, Y., Liang, Q., Zhang, S., Xu, C., Song, W., Tan, S., Rong, P., Wang, W. (2016). Resveratrol inhibits Hexokinases II mediated glycolysis in non-small cell lung cancer via targeting Akt signaling pathway. *Experimental Cell Research*, *349*(2), 320-327. [CrossRef]

39. Xu, D., Jin, J., Yu, H., Zhao, Z., Ma, D., Zhang, C., Jiang, H. (2017). Chrysin inhibited tumor glycolysis and induced apoptosis in hepatocellular carcinoma by targeting hexokinase-2. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *36*(1), 44. [CrossRef]

40. Tao, L., Wei, L., Liu, Y., Ding, Y., Liu, X., Zhang, X., Wang, X., Yao, Y., Lu, J., Wang, Q., Hu, R. (2017). Gen-27, a newly synthesized flavonoid, inhibits glycolysis and induces cell apoptosis via suppression of hexokinase II in human breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, *125*, 12-25. [CrossRef]

41. Yao, J., Liu, J., Zhao, W. (2018). By blocking hexokinase-2 phosphorylation, limonin suppresses tumor glycolysis and induces cell apoptosis in hepatocellular carcinoma. *OncoTargets and Therapy*, *11*, 3793. [CrossRef]