

ONKOGENNÉ FORMY IZOCITRÁTDEHYDROGENÁZY: MECHANIZMY KARCINOGENÉZY A VZNIKU REZISTENCIE NA CHEMOTERAPEUTIKÁ

VERONIKA VOZÁRIKOVÁ

Katedra genetiky, Univerzita Komenského v Bratislave,
Prírodovedecká fakulta, Mlynská dolina, Ilkovičova 6,
842 15 Bratislava 4, Slovensko
veronika.vozarikova@uniba.sk

Došlo 1.9.21, prepracované 2.6.22, prijaté 11.7.22.

Kľúčové slová: izocitrátdehydrogenáza, onkogénna mutácia, D-2-hydroxyglutarát, chemoterapia, rezistencia

• <https://doi.org/10.54779/chl20220536>

Obsah

1. Úvod
2. Izocitrátdehydrogenáza
 - 2.1. Onkogénne formy izocitrátdehydrogenázy
 - 2.2. Neomorfná aktivita onkogénnej izocitrátdehydrogenázy
3. Účinok D-2-hydroxyglutarátu na bunku
4. Terapia nádorových ochorení asociovaných s onkogénnou izocitrátdehydrogenázou
 - 4.1. Chemoterapeutiká špecificky cieleňé na onkogénnu izocitrátdehydrogenázu
5. Rezistencia voči inhibítorom onkogénnej izocitrátdehydrogenázy
6. Záver

1. Úvod

Pre široké spektrum nádorových ochorení je v počiatkom štádiu tumorigenézy typická mutácia v metabolickom enzýme izocitrátdehydrogenáza (IDH). Štandardný enzým katalyzuje premenu izocitrátu na α -ketoglutarát (α -KG). V prípade bodovej mutácie v aktívnom mieste izoenzýmov IDH1 a IDH2 nadobúda mutantný enzým (IDH^{onc}) onkogénny potenciál získaním novej funkcie, ktorou je premena α -KG na onkometabolit D-2-hydroxyglutarát (D-2HG). Z dôvodu, že IDH^{onc} hrá kľúčovú úlohu pri vzniku mnohých typov rakoviny, je vynakladaná veľká snaha na využitie IDH^{onc} ako terapeutického cieľa, na ktorý je možné zamieriť špecifické inhibítory. Niektoré z liečiv sa dostali do klinickej praxe, ich používanie však komplikuje vznik rezistencie. Cieľom textu je poskytnúť najnovšie informácie o mechanizmoch karcinogenézy indukovanej IDH^{onc}, špecifických inhibítoroch potláčajúcich

aktivitu IDH^{onc} a o mechanizmoch rezistencie komplikujúcich liečbu založenú na týchto chemoterapeutikách.

2. Izocitrátdehydrogenáza

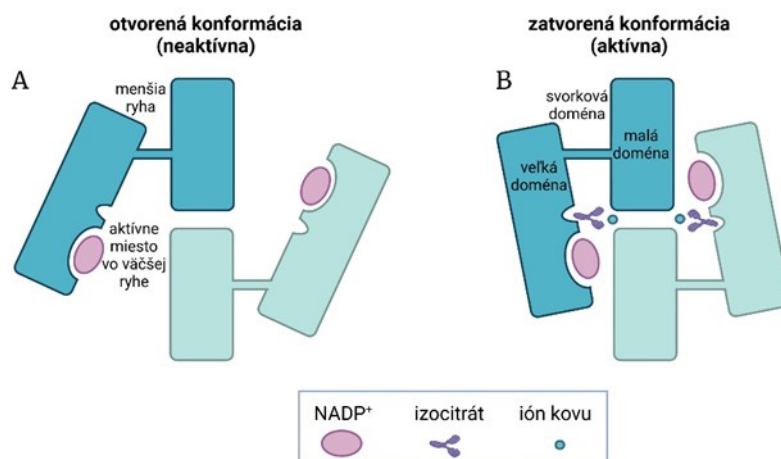
Metabolické IDH (EC1.1.1.42) tvoria rodinu enzýmov vyskytujúcich sa od baktérií až po človeka. Katalyzujú oxidačnú dekarboxyláciu izocitrátu za vzniku α -KG a CO₂ a súčasne dochádza k redukcii dinukleotidového kofaktoru, ktorý sa líši v závislosti od izoformy enzýmu^{1,2}. V ľudskom jadrovom genóme sú kódované tri izoenzýmy IDH: NADP⁺-závislé IDH1 a IDH2 a NAD⁺-závislá IDH3. Po jednom géne sú kódované IDH1 a IDH2 a majú homodimérnu štruktúru, kým IDH3 je kódovaná tromi génmi a nadobúda štruktúru heterotetraméru³.

Mitochondriálny izoenzým IDH3 je za fyziologických podmienok schopný katalyzovať len priamu reakciu a má bezprostredný význam pre Krebsov cyklus prostredníctvom produkcie α -KG vstupujúceho do cyklu. Cytosolická a peroxizomálna IDH1 a mitochondriálna IDH2 sú vzájomne evolučne príbuznejšie a na úrovni aminokyselínovej sekvencie zdieľajú až 70% identitu. Nepriamo participujú aj na Krebsovom cykle tým, že na základe pomerov v bunke vďaka schopnosti reverzibilnej katalýzy regenerujú prevyšujúci α -KG späť na izocitrát. Význam však majú aj pre generovanie NADPH zohrávajúceho úlohu v ochrane pred oxidatívnym poškodením a pri ďalších metabolických dráhach⁴.

Štruktúra NADP⁺-závislej IDH1 a IDH2 je tvorená homodimérom nadobúdajúcim tri konformačné stavy. Enzým je aktívny v zatvorenej konformácii, neaktívny v otvorenej konformácii a pri prechode získava čiastočne otvorenú konformáciu. Rozdiel medzi stavmi spočíva v štruktúrnom segmente aktívneho miesta, ktorý nadobúda pri zatvorenej konformácii štruktúru α -helixu a pri otvorenej konformácii štruktúru slučky⁵.

Podjednotka IDH1 pozostáva podobne ako podjednotka IDH2 z troch domén: malej, veľkej a svorkovej domény (obr. 1). Podjednotka IDH1 je tvorená 414 aminokyselinami: veľká doména je z rezíduí 1-103 a 286-414, malá doména z rezíduí 104-136 a 186-285 (striedanie α -helixov a β -listov) a svorka z rezíduí 137-185 (dva antiparalelné β -listy naskladané na sebe). Spojenie malej a veľkej podjednotky je prostredníctvom β -listu, pričom vznikajú po jeho stranách dve ryhy. Väčšia ryha obsahuje aktívne miesto a na uľahčenie prístupu substrátu a kofaktoru má hydrofilné vlastnosti. Menšia ryha má hydrofóbne reziduá vo vnútri a hydrofilné reziduá pri okraji, čo umožňuje reguláciu zmien konformácie⁵.

Z hľadiska zamerania tejto práce sú dôležité reziduá v aktívnom mieste enzýmu, ktoré sprostredkujú väzbu so substrátom tým, že vytvárajú vodíkové väzby s jeho



Obr. 1. Schéma štruktúry a konformačných stavov NADP^+ -závislých IDH. A. Otvorená (neaktívna) konformácia podjednotiek IDH s naviazaným kofaktorom. B. Zatvorená (aktívna) konformácia podjednotiek IDH s naviazaným kofaktorom NADP^+ , izocitrátom a iónom kovu. Podjednotka je tvorená malou, svrkovou a veľkou doménou. Aktívne miesto je vo väčšej ryhe. Upravené podľa (cit.⁵). Vytvorené pomocou Biorender.com

β -karboxylom. Túto funkciu plnia rezíduá $\text{IDH1}^{\text{R132}}$, analogické rezíduum $\text{IDH2}^{\text{R172}}$ a tiež $\text{IDH1}^{\text{R100}}$ a $\text{IDH2}^{\text{R140}}$ nachádzajúce sa v ich blízkosti⁶. Zároveň $\text{IDH1}^{\text{R132}}$ vytvára vodíkovú väzbu s $\text{IDH1}^{\text{D275}}$ v rámci jednej podjednotky a väzbu s $\text{IDH1}^{\text{D279}}$ na druhej podjednotke, čo plní úlohu zarážky držiacej enzým v otvorenej konformácii, ktorá je odstránená vstupom izocitrátu, čo spôsobí zatvorenie enzýmu a nadobudnutie aktívneho stavu^{7,8}.

2.1. Onkogénne formy izocitrátdehydrogenázy

Kľúčový faktor pre iniciáciu a progresiu rakoviny je reprogramovanie metabolizmu⁹. Mutácia metabolického enzýmu je však primárnou príčinou transformácie vzácne – napr. mutácia v enzymoch Krebsovho cyklu, ako sú fumarátdehydrogenáza a sukcinátdehydrogenáza, pri ktorých dochádza k strate funkcie enzýmu¹⁰. Iný mechanizmus možno pozorovať v prípade metabolického enzýmu IDH, kedy má mutácia v aktívnom mieste enzýmu za následok získanie novej funkcie enzýmu¹¹.

Prvýkrát bola objavená *missense* mutácia $\text{IDH1}^{\text{R132C}}$ pri štúdiu molekulárneho mechanizmu vzniku kolorektálneho karcinómu¹². Nasledovala detekcia mutácií $\text{IDH1}^{\text{R132C}}$, $\text{IDH1}^{\text{R132H}}$, $\text{IDH1}^{\text{R132S}}$, $\text{IDH1}^{\text{R132L}}$ a $\text{IDH2}^{\text{R172X}}$ v glioblastómoch^{13,14}. Mutácie v IDH1 a IDH2 sú však asociované s veľkým množstvom typov rakoviny, medzi ktoré patrí glióm, akútna myeloidná leukémia (AML), chondrosarkóm, karcinóm prostaty, papilárny karcinóm prsníka, cholangiokarcinóm alebo melanóm¹⁵ (tab. I v Doplnku práce). Najčastejšie sa vyskytujúce sú mutácie $\text{IDH1}^{\text{R132H}}$ a $\text{IDH2}^{\text{R140Q}}$ alebo $\text{IDH2}^{\text{R172K}}$ (cit.⁴). V IDH1 a IDH2 sa podarilo zaznamenať aj iné *missense* mutácie mimo aktívneho miesta enzýmu, avšak bez efektu na získanie novej funkcie enzýmu¹⁶.

Všetky spomínané mutácie v IDH1 a IDH2 sú somatického charakteru a vznikli náhodne v konkrétnom tkanive počas života⁴. Odlišný mechanizmus bol pozorovaný pri vrodených ochoreniach nededičného charakteru – Ollierovej chorobe a Maffucciho syndróme, ktoré vykazujú znaky somatického mozaicizmu. Sú typické nezhubnými nádormi (enchondróm, hemangióm) s IDH^{onc} pozadím. Možná je ich následná malígna transformácia alebo vznik sekundárnych malígných transformácií (AML, gliómy)¹⁷.

Pri nádoroch boli zaznamenané mutácie aj v podjednotkách IDH3, ale ide len o sprievodné mutácie bez iniciačného potenciálu pôsobiť karcinogénne¹⁸. Vplyv na transformáciu buniek alebo progresiu nádoru však môže mať aj zmena produkcie podjednotiek IDH3, resp. môže dochádzať ku korelácii produkcie jednotlivých podjednotiek s prognózou ochorenia¹⁹.

2.2. Neomorfná aktivita onkogénnej izocitrátdehydrogenázy

Somatická *missense* mutácia v aktívnom mieste enzýmu sa vyskytuje výhradne v heterozygotnom stave na jednej z dvoch alieli génu *IDH1* alebo *IDH2*. V dôsledku mutácie sa zhoršuje interakcia aktívneho miesta enzýmu so substrátom izocitrátom. Namiesto izocitrátu, ktorý sa má premieňať na α -KG, sa preferenčne začne viazať do aktívneho centra práve α -KG a ten je premieňaný na D-2HG, pričom reakcia je sprevádzaná spotrebovaním NADPH (cit.^{3,8,11}). Okrem D-2HG existuje aj L-2HG, čo je dané hydroxylovou skupinou viazanou na druhý uhlík 5-uhlíkatého aniónu kyseliny 2-hydroxyglutarátu²¹. Na rozdiel od D-2HG však s IDH^{onc} vznik molekuly L-2HG asociované nie je^{6,11}. Zapojenie enzymatickej aktivity IDH^{onc} do kontextu štandardných IDH je znázornené na

obr. 2. Produkcia D-2HG pri výskyte formy IDH^{onc} je 10–100násobne vyššia, ako za fyziologických podmienok a koncentrácia D-2HG sa pohybuje okolo $0,005\text{--}0,035\text{ mol m}^{-3}$ (cit. ^{11,22,23}). Mutácia $IDH1^{R132H}$ vedie k produkcii porovnateľne vysokého množstva D-2HG ako jej analogická mutácia $IDH2^{R172K}$, na rozdiel od mutácie $IDH2^{R140Q}$, ktorá má na produkciu D-2HG menší vplyv²⁰. D-2HG sa hromadí v nádore, ale môže byť exportovaný aj do extracelulárneho priestoru a následne detegovaný v telových tekutinách, krvnom sére ako aj v cerebrospinálnom moku pacientov^{24,25}.

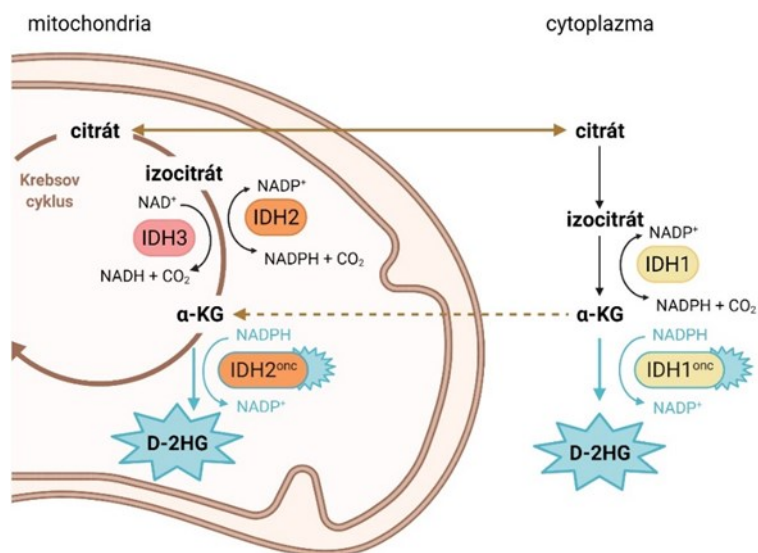
Mutácia len v jednej alele génu umožňuje vznik štandardnej, ako aj mutantnej podjednotky enzýmu⁴. V *in vitro* podmienkach vykazuje mutant $IDH1^{R132H}$ vyššiu produkciu D-2HG pri nadbytku substrátu v homodimérom i heterodimérom stave v porovnaní so štandardným enzýmom^{8,26}. Bola snaha identifikovať, či je diména štruktúra esenciálna pre vykonávanie neormorfnej aktivity. Nezávislosť produkcie D-2HG od štandardnej podjednotky dokázal experiment s inaktíváciou štandardnej, ako aj mutantnej podjednotky, no tiež použitie monomérskej bakteriálnej IDH druhu *Azotobacter vinelii* s vnesenou mutáciou IDH^{R547H} (analogická k $IDH1^{R132H}$) (cit. ⁸). V prípade fyziologických podmienok v bunke je však množstvo substrátu limitované a mutantná $IDH1$ v komplexe so štandardnou podjednotkou produkuje viac D-2HG, nakoľko štandardná podjednotka v heterodimérom komplexe viaže izocitrát a katalyzuje jeho premenu na α -KG a ten rovno viaže mutantnú podjednotku a premieňa ho na D-2HG. V bunke však existuje rozdiel medzi prostredím cytosolickej $IDH1$ a mitochondriálnej $IDH2$, ktorý spočíva v odlišnej koncentrácii izocitrátu. Aktivita $IDH2^{onc}$ v prostredí bohatom na izocitrát aj α -KG nie je závislá od heterodimérskej štruktúry poskytujúcej aktivitu štandardnej podjednotky²⁰. $IDH1$ v prostredí s nižšou hladinou substrátu profituje z aktivity

štandardnej podjednotky. Význam heterodimérskej štruktúry $IDH1$ je potvrdený aj na glióme, v ktorom dochádzalo pri strate štandardnej podjednotky k 14násobnému zníženiu produkcie D-2HG (cit. ²⁷).

Existuje viacero hypotéz vysvetľujúcich mechanizmus účinku mutácie v IDH na získanie novej funkcie. Jedna z prvých vychádza z úlohy R132 ako západky držiacej enzým v otvorenej konformácii a navrhuje posunutie rovnováhy smerom k zatvorenej konformácii. Zmena R132H spôsobuje stratu schopnosti väzby medzi R132 a β -karboxylom izocitrátu, čo je sprevádzané prestavbou aktívneho miesta a k posunu kritických pozícií. Presunuté sú Y139 v jednej podjednotke a K212 v druhej podjednotke. Na mieste, kde by sa mal nachádzať β -hydroxyl izocitrátu, sa v dôsledku mutácie nachádza hydroxylová skupina Y139 (cit. ¹¹). Je to však v rozpore s ďalším pozorovaním zhoršenej schopnosti tvorby zatvorenej konformácie v inej štúdii, v ktorej bolo preorganizovanie aktívneho miesta spájané s významom Y139 pre kompenzáciu zvýšeného negatívneho náboja na C2 atóme α -KG počas prenosu hydridového aniónu z NADPH na α -KG, kľúčového pre vznik D-2HG. V prípade účinku mutácie $IDH2^{R140Q}$ je kľúčovým parametrom zväčšenie vzdialenosti pre kľúčové prídanie β -karboxylu v procese konverzie α -KG na izocitrát⁷.

3. Účinok D-2-hydroxyglutarátu na bunku

Metabolit D-2HG vznikajúci ako produkt neormorfnej reakcie katalyzovanej IDH^{onc} vystupuje v bunke ako onkometabolit a ovplyvňuje široké spektrum bunkových procesov³. Hromadiaci sa D-2HG v nádoroch interferuje s celým spektrom enzýmov, najmä s α -KG-závislými dioxygenázami. Rozdiel v štruktúre spočíva len v jednej funkčnej sku-



Obr. 2. Schéma enzymatických aktivít ľudských izocitrátdehydrogenáz v štandardnom aj mutantnom variante. Účinkom onkogénnej $IDH1^{onc}$ a $IDH2^{onc}$ dochádza k syntéze onkometabolitu D-2HG. Vytvorené pomocou Biorender.com

pine na C2, a to kyslíku u α -KG a hydroxylovej skupine D-2HG, preto môže D-2HG vystupovať ako kompetitívny inhibítor enzýmov využívajúcich α -KG (cit.²³). V ľudskom genóme je približne 60 rôznych α -KG-závislých dioxygenáz a spektrum funkcií, ktoré tieto enzýmy plnia je veľmi široké. Inhibované môžu byť histón demetylázy, DNA metyltransferázy alebo *ten-eleven translocation* (TET) 5-metylcytozínhydroxylázy, čo spôsobuje masívne epigenetické zmeny. Vplyv má D-2HG aj na prolylhydroxylázy, čím dochádza k akumulácii hypoxiou-indukovaného faktoru 1a (HIF-1a), čo navodzuje stav podobný podmienkam hypoxie a vedie k narušeniu schopnosti diferenciácie buniek. Zoznam funkcií bunky ovplyvnených D-2HG obsahuje tiež opravu DNA, metabolizmus mastných kyselín a reguláciu tvorby kolagénu²³.

Okrem α -KG je chemická štruktúra D-2HG podobná aj štruktúre sukcinátu a fumarátu – substrátom enzýmov Krebsovho cyklu sukcinátdehydrogenáza a fumaráthydratáza. D-2HG pôsobí ako kompetitívny inhibítor týchto enzýmov, čo spôsobuje akumuláciu sukcinátu a fumarátu, ktoré sa z energetického hľadiska môžu premeniť späť na sukcinyl-CoA. To vedie k zvýšeniu koncentrácie donoru sukcinylvej skupiny – sukcinyl-CoA (cit.²⁸). Sukcinylácia ako posttranslačná modifikácia proteínov prebieha najmä neenzymaticky, a preto je priamo úmerná od koncentrácie donoru²⁹. Dôsledkom hypersukcinylácie je poškodenie mitochondriálnych funkcií a u nádorových buniek aj navodenie rezistencie voči apoptóze²⁸.

4. Terapia nádorových ochorení asociovaných s onkogénnou izocitrátdehydrogenázou

Nádorové ochorenia asociované s IDH^{onc} disponujú špecifickými charakteristikami, ktoré môžu byť vhodným terčom terapie. Jednou z terapeutických stratégií na elimináciu negatívnych dopadov IDH^{onc} a rekonštrukciu pôvodného stavu je využitie hypometylačných agensov. Azacitidín je analógom cytidínu a decitabín je deoxyderivátom azacitidínu. Účinok azacitidínu na xenograft u myši derivovaný z IDH^{onc} ľudského gliómu sa prejavil na znížení metylácie promotorových oblastí, indukciu diferenciácie gliových buniek, redukcii proliferácie a znížení rastu nádoru³⁰. Inhibícia DNA metyltransferáz látkami ako azacitidín alebo decitabín ukázala sľubné výsledky tiež u AML, ako aj u myelodysplastického syndrómu, ktoré sú všeobecne ťažko liečiteľné. Účinok azacitidínu sa v III. fáze klinických skúšok prejavil signifikantným zvýšením celkového prežívania pacientov³¹.

Nakoľko IDH^{onc} je neoantigén cudzí zdravým bunkám a jeho prítomnosť je viazaná výhradne na nádorové bunky, je vhodným cieľom imunoterapie. Zároveň je produkovaný vo veľkom množstve, nakoľko ide o enzým dôležitý pre metabolizmus. Antigen je navyše vysoko uniformný a obsahuje vhodný epitop využiteľný pri vakcinácii. Experimenty s anti-IDH1^{R132H} vakcináciou na humanizovanom modeli myši využívali ako cieľ terapie priamo mutančný epitop a rozpoznanie prostredníctvom T-bunko-

vej imunity³². Po pozitívnych výsledkoch na zvieracom modeli sa začali realizovať klinické skúšky I. stupňa vakcíny označenej ako NOA-16. Ide o peptidovú vakcínu proti IDH1^{R132H} podávanú pacientom s novo diagnostikovaným astrocytómom III. a IV. kategórie. Po podaní vakcíny bol zaznamenaný vznik T-bunkovej alebo protilátkovej imunity až u 93,3 % pacientov³³.

4.1. Chemoterapeutiká špecificky cieleňé na onkogénnu izocitrátdehydrogenázu

Pri navrhovaní liečiva špecifického voči IDH^{onc} je potrebné zvážiť viacero faktorov. Kompetitívny inhibítor namierený na miesta viažuce NADP⁺ alebo α -KG by mohol interferovať s funkciou akéhokoľvek enzýmu interagujúceho s NADP⁺ alebo α -KG a tak aj samotná účinnosť liečiva *in vivo* by bola z dôvodu nešpecifickej väzby variabilná. Zároveň by takto dochádzalo k inhibícii aj samotnej štandardnej IDH, čo by malo dopad na celkový metabolizmus⁴.

Mutácia nastáva len v jednej alele génu, a preto je väčšina molekúl IDH^{onc} tvorená heterodimérom²². Zacielenie liečiva musí byť špecifické len na mutančný enzým a na to je vhodné využiť vlastnosť špecifickú pre IDH^{onc} enzýmov – zníženú stabilitu. V IDH1 plní funkciu regulačného segmentu α -helix (označovaný ako α 10) tvorený rezíduami 271-286 malej domény podjednotiek⁵. Za štandardných podmienok bráni prístupu inhibítora enzýmu k alosterickému miestu. *Missense* mutácia, napr. IDH1^{R132H}, má však za následok destabilizáciu regulačného segmentu zrušením interakcie R132:N271 a prístup inhibítora umožňuje. U IDH2 sú stabilnejšie regulačné segmenty α 10 tvorené rezíduami 311-326 a tie bránia prístupu inhibítora do alosterického miesta štandardného IDH2, ako aj IDH2^{R140Q} a IDH2^{R172K}. Analogickou interakciou k R132:N271 u IDH1 je iónová interakcia K172:N310 u IDH2, no v prípade jej prerušenia je destabilizácia len čiastočná. Navyše alosterické miesto IDH2 neobsahuje rezídua interagujúce priamo s inhibítorm, ako je tomu v prípade IDH1. Na rozdiel od IDH1 obsahujúcej S280 vytvárajúci interakcie s hydrofóbnym vnútrom diméru, v IDH2 je analogický I319 vytvárajúci hydrofóbné interakcie cez rozhranie diméru³⁴.

Spektrum špecifických IDH^{onc} inhibítorov v klinických štúdiách, ako aj v klinickej praxi je široké^{4,30,35–38}. Bližšie budú popísané dve chemoterapeutiká schválené na klinické použitie u pacientov s AML (zhubné nádorové ochorenie postihujúce kmeňové bunky hematopoetického systému), pri ktorom dochádza ku klonálnemu množeniu nediferencovaných myeloidných prekurzorov. Výsledkom je poškodenie kostnej drene a hematopoézy. Ochorenie sa objavuje prevažne u pacientov nad 60 rokov a je spojené s enormnou molekulárnou heterogenitou, pričom u väčšiny pacientov je v rámci DNA detegovateľná viac ako 1 mutácia^{39,40}. Pre AML je typickejšia mutácia v IDH2 než v IDH1, čo je v rozpore s pomerom mutácií napr. u gliómov⁶. Výskyt IDH1^{onc} bol zaznamenaný u 8 % a IDH2^{onc} u 15 % pacientov s AML. Z nich 35 % pacientov malo vo svojej DNA mutáciu v pozícii IDH1^{R132},

54 % v IDH2^{R140} a 11 % v IDH2^{R172} (cit. ⁴¹).

Prvou voľbou liečby AML je cytotoxická chemoterapia, po ktorej môže nastať remisia. U cca 50–85 % starších pacientov však po nej zvykne nasledovať recidíva a vznik rezistentných foriem (R/R) s následnou zlou prognózou. Existuje aj skupina pacientov bez možnosti konvenčnej chemoterapie pre pridružené ochorenia, ktorí sú odkázaní na paliatívnu liečbu⁴². Pre tieto prípady v súčasnosti existuje v závislosti od genetického podkladu 5 kategórií špecifických terapeutík na liečbu AML: kyselina *all-trans* retinová, midostaurín, inhibítory poly-ADP-ribóza-polymerázy (PARP), inhibítory histón-lyzín-*N*-metyltransferázy (DOT1L) a inhibítory IDH^{onc} (cit. ⁴¹).

Medzi inhibítory IDH^{onc} používané pri R/R AML patria liečivá enasidenib a ivosidenib. Mechanizmus ich účinku nespočíva v ničení nádorových buniek, ale v znížení produkcie D-2HG a v obnovení schopnosti bunkovej diferenciácie⁴³. Prvým inhibítorm IDH^{onc} schváleným Správou potravín a liečiv (FDA) je enasidenib (AG-221) s obchodným názvom Idhifa[®]. Ide o inhibítora IDH2^{R140Q} a IDH2^{R172K} patriaci medzi triazíny – triedu heterocyklických štruktúr obsahujúcich dusík^{36,44}. Enasidenib sa viaže do alosterického miesta na rozhraní homodiméru, čo udržiava enzým v otvorenej konformácii a nedochádza ku vzniku konformácie potrebnej pre katalýzu reakcie^{7,44}. Účinnosť enasidenibu sa prejavila v *in vitro* testoch poklesom množstva D-2HG o viac ako 90 % a u pacientov s AML a s myelodysplastickým syndrómom v krvnej plazme o 98 %. Údaje z klinických skúšok I/II kategórie na pacientoch s AML preukázali celkovú mieru odpovede 38,8 % a úspešnosť úplnej remisie 19,6 %. Medián celkového prežívania bol 8,8 mesiaca. Miera prežívania sa medzi IDH2^{R140Q} a IDH2^{R172} nelíšila a v prípade IDH2^{R172} korelovala miera zníženia hladiny D-2HG s kompletnou remisiou⁴⁵.

Inhibítora ivosidenib (AG-120) je dostupný pod komerčným názvom TIBSOVO[®]. Vznikol optimalizáciou inhibítora AGI-5198 a patrí do triedy fenyglycínov⁴. Ivosidenib je vysoko špecifický pre inhibíciu IDH1^{R132H}, ale účinnosť inhibície je podobná aj pre zámenu aminokyseliny arginínu za cysteín, glycín, leucín alebo serín⁴³. V I. fáze klinických štúdií podávania ivosidenibu pacientom s IDH1^{onc} AML bolo pozorované zníženie úrovne D-2HG v krvnej plazme pacientov až o 99,7 % a v kostnej dreni až o 99,9 % (cit. ⁴⁶). Miera remisie bola 30,4 % a celková miera odpovede bola 41,6 %. Medián trvania odpovede bol približne 8,2 mesiaca. Zaujímavé je pozorovanie, že u 21 % pacientov s úplnou remisiou alebo s remisiou s čiastočným hematologickým zotavením dochádzalo ku poklesu priemernej frekvencie alely IDH1^{onc} v mononukleárných bunkách kostnej drene a v neutrofiloch. U pacientov bez remisie zostávala alelová frekvencia mutácie IDH1^{onc} v priebehu času stabilne zvýšená, pričom táto skutočnosť mala vplyv aj na dĺžku prežívania – pacienti s nedetekovateľnou IDH1^{onc} mali dlhšiu remisiu (11,1 oproti 6,5 mesiaca). Rozdiel bol aj v mediáne celkového prežívania (14,5 oproti 10,2 mesiaca)⁴⁷. Ivosidenib absolvoval aj klinické skúšky zamerané na jeho účinky na solídne tumory asociované s IDH1^{onc} – cholangiokarci-

nóm, chondrosarkóm a glióm. Výsledkom bolo zníženie hladiny D-2HG až o 98 % (cit. ⁴⁸). Sľubne sa javí aj kombinované využitie inhibítorov spolu s epigeneticky miernym liečivom, napr. hypometylačným agensom decitabínom⁴⁹.

5. Rezistencia voči inhibítorm onkogénnej izocitrátdehydrogenázy

Genetické analýzy uskutočnené pred podaním inhibítora IDH^{onc} odhalili niektoré mutácie súvisiace s neskôr pozorovanou primárnou rezistenciou na liečbu⁵⁰. Rezistencia na inhibítora IDH1^{onc} bola pozorovaná pri mutácii v génoch kódujúcich RTK dráhu (dráha zahŕňajúca receptor s tyrozínkinázovou aktivitou)⁴⁷. Účinok inhibítora IDH2^{onc} bol zoslabený v súvislosti s mutáciou v MAPK (mitogen-activated proteinkinase) signálnej dráhe alebo mutáciou v NRAS (typ Ras proteínu, GTPáza)⁵¹. Nakoľko výstupom tejto dráhy je aj indukcia diferenciácie⁵², podporuje to teóriu, že ovplyvnenie diferenciácie je hlavným mechanizmom účinku inhibítorov IDH^{onc} (cit. ^{51,53}).

Jedným zo spôsobov vzniku rezistencie voči liečivu môže byť aj „prepnutie izoformy“ – v prípade liečby zamierenej na IDH1^{onc} vznik onkogénnej mutácie v IDH2, a naopak. Tým sa obnoví produkcia D-2HG v bunkách, nakoľko ďalej nepodlieha inhibícii použitým liečivom. Tento jav ilustruje možnosť kombinovanej terapie inhibítormi IDH^{onc}, napr. ivosidenibu s enasidenibom, prípadne s ďalším z inhibítorov⁵⁴.

Samostatným typom vzniku rezistencie je spontánny vznik sekundárnych mutácií v IDH1 a IDH2, ktoré navodzujú rezistenciu znemožnením väzby IDH^{onc} inhibítora na molekulu enzýmu. Tento účinok bol pozorovaný u skupiny pacientov s IDH1^{onc} aj s IDH2^{onc}-pozitívnou AML po liečbe ivosidenibom a enasidenibom^{50,55}. Vznik sekundárnej rezistencie nastal po počiatočnom účinku inhibítora prejavujúcim sa znížením úrovne D-2HG a normalizáciou krvného obrazu. Počas kontinuálne pokračujúcej terapie sa hladiny D-2HG zvýšili a nastali príznaky progresie. Príkladmi sekundárnych mutácií v IDH2 sú Q316E a I319M v rámci exónu 7 (onkogénna R140Q je v exóne 4). V tomto prípade ide o somatické mutácie v pozícii *trans* (štandardná podjednotka heterodimérnej IDH2). Účinok Q316E spočíval v strate vodíkovej väzby s enasidenibom a I319M stéricky bránil väzbe enasidenibu. Samotné mutácie Q316E a I319M nijako neprispeli ku katalýze vzniku D-2HG, len umožnili jeho syntézu mutantnou podjednotkou tým, že zabránili inhibítora viazať sa do alosterického miesta na rozhraní enzýmu a udržiavať enzým v otvorenej, neaktívnej konformácii. Kompenzačné mutácie boli pozorované aj u IDH1, napríklad S280F (analogická pozícia k I319 v IDH2), v tomto prípade v pozícii *cis* (mutantná podjednotka heterodimérnej IDH1)⁵⁵. V kombinácii so vznikom kompenzačných mutácií v IDH1 bolo pozorované umocnenie rezistencie mechanizmom primárnej rezistencie, napr. v rámci dráhy RTK (cit. ⁵⁰).

6. Záver

Za 15 rokov od objavenia prvej mutácie IDH^{onc} asociovanej s nádorovým ochorením prišlo k veľkému posunu chápania mechanizmu pôsobenia tejto mutácie na úrovni samotného enzýmu, ale tiež pôsobenia onkometabolitu D-2HG na bunku. Poznatky sa posunuli dosť ďaleko na to, aby vznikali nové spôsoby liečby. Nie je prekvapením, že súčasné terapeutické prostriedky môžu byť značne limitované vznikom rezistencií. To je však len ďalšou výzvou na ešte intenzívnejšie porozumenie procesov a navrhnutie stratégií, ako prípadné rezistencie obísť.

Internetová verzia tejto práce obsahuje navyše doplnujúcu časť. Pre vyhľadanie plnej verzie článku vrátane príslušného dodatku je potrebné otvoriť aktuálnu webovú stránku Chemických listov.

Podakovanie patrí Prof. RNDr. Lubomirovi Tomáškoví, DrSc. za vedenie projektu, odborné konzultácie, bystré postrehy, ako aj za ľudskú spoluprácu. Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Advancing University Capacity and Competence in Research, Development and Innovation, ITMS2014+: 313021X329, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a grantov Agentúry pre podporu vedy a výskumu (APVV-19-0068), VEGA (1/0061/20) a Univerzity Komenského v Bratislave (UK/ 145/2021).

Zoznam skratiek

α -KG	α -ketoglutarát
AML	akútne myeloidná leukémia
D-2HG/ L-2HG	D-2-hydroxyglutarát/ L-2-hydroxyglutarát
DOT1L	histón-lyzín-N-metyltransferázy
HIF-1a	hypoxiou-indukovaný faktor 1a
IDH	izocitrátdehydrogenáza
IDH ^{onc}	onkogénny variant izocitrátdehydrogenázy
MAPK	mitogénom aktivovaná proteínkináza
PART	poly-ADP-ribóza-polymerázy
R/R	recidíva so vznikom rezistentných foriem
RTK	dráha zahŕňajúca receptor s tyrozínkinázovou aktivitou
TET	<i>ten-eleven translocation</i> 5-metylcytozín hydroxyláza

LITERATÚRA

- Haselbeck R. J., McAlister-Henn L.: *J. Biol. Chem.* 268, 12116 (1993).
- Stoddard B. L., Cohen B. E., Brubaker M., Mesecar A. D., Koshland D. E.: *Nat. Struct. Biol.* 5, 891 (1998).
- Horbinski C.: *Acta Neuropathol.* 125, 621 (2013).
- Dang L., Su S. S. M.: *Annu. Rev. Biochem.* 86, 305 (2017).
- Xu X., Zhao J., Xu Z., Peng B., Huang Q., Arnold E., Ding J.: *J. Biol. Chem.* 279, 33946 (2004).
- Ward P. S. a 15 spoluautorov: *Cancer Cell* 17, 225 (2010).
- Yang B., Zhong C., Peng Y., Lai Z., Ding J.: *Cell Res.* 20, 1188 (2010).
- Pietrak B. a 11 spoluautorov: *Biochemistry* 50, 4804 (2011).
- Hanahan D., Weinberg R. A.: *Cell* 144, 646 (2011).
- Schmidt C., Sciacovelli M., Frezza C.: *Semin. Cell Dev. Biol.* 98, 15 (2019).
- Dang L. a 21 spoluautorov: *Nature* 462, 739 (2009).
- Sjöblom T. a 27 spoluautorov: *Science* 314, 268 (2006).
- Parsons D. W. a 32 spoluautorov: *Science* 321, 1807 (2008).
- Yan H. a 17 spoluautorov: *N. Engl. J. Med.* 360, 765 (2009).
- Cohen A. L., Holmen S. L., Colman H.: *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 13, 345 (2013).
- Ward P. S., Cross J. R., Lu C., Weigert O., Abel-Wahab O., Levine R. L., Weinstock D. M., Sharp K. A., Thompson C. B.: *Oncogene* 31, 2491 (2012).
- Amary M. F. a 17 spoluautorov: *Nat. Genet.* 43, 1262 (2011).
- Al-Khallaf H.: *Cell Biosci.* 7, 37 (2017).
- Tommasini-Ghelfi S., Murnan K., Kouri F. M., Mahajan A. S., May J. L., Stegh A. H.: *Sci. Adv.* 5, 5 (2019).
- Ward P. S., Lu C., Cross J. R., Abdel-Wahab O., Levine R. L., Schwartz G. K., Thompson C. B.: *J. Biol. Chem.* 288, 3804 (2013).
- Gibson K. M., Brink H. J. T., Schor D. S. M., Kok R. M., Bootsma A. H., Hoffmann G. F., Jakobs C.: *Pediatr. Res.* 34, 277 (1993).
- Jin G., Reitman Z. J., Spasojevic I., Batinic-Haberle I., Yang J., Schmidt-Kittler O., Bigner D. D., Yan H.: *PLoS One* 6, e16812 (2011).
- Xu W. a 19 spoluautorov: *Cancer Cell* 19, 17 (2011).
- Sellner L. a 10 spoluautorov: *Eur. J. Haematol.* 85, 457 (2010).
- Kalinina J. a 15 spoluautorov: *Clin. Cancer Res.* 22, 6256 (2016).
- Leonardi R., Subramanian C., Jackowski S., Rock C. O.: *J. Biol. Chem.* 287, 14615 (2012).
- Jin G. a 11 spoluautorov: *Cancer Res.* 73, 496 (2013).
- Li F. a 18 spoluautorov: *Mol. Cell* 60, 661 (2015).
- Zhang Z., Tan M., Xie Z., Dai L., Chen Y., Zhao Y.: *Nat. Chem. Biol.* 7, 58 (2011).
- Mondesir J., Willekens C., Touat M., de Botton S.: *J. Blood Med.* 7, 171 (2016).
- Dombret H. a 23 spoluautorov: *Blood* 126, 291 (2015).
- Schumacher T. a 27 spoluautorov: *Nature* 512, 324 (2014).
- Platten M. a 20 spoluautorov: *Neuro. Oncol.* 20, 226 (2018).
- Xie X. a 22 spoluautorov: *Structure* 25, 506 (2017).

35. Medeiros B. C., Fathi A. T., DiNardo C. D., Pollyea D. A., Chan S. M., Swords R.: *Leukemia* 31, 272 (2017).
36. Golub D., Iyengar N., Dogra S., Wong T., Bready D., Tang K., Modrek A. S., Placantonakis D. G.: *Front. Oncol.* 9, 417 (2019).
37. Liu X., Gong Y.: *Biomark. Res.* 7, 22 (2019).
38. Kaminska B., Czapski B., Guzik R., Król S. K., Gielniewski B.: *Molecules* 24, 968 (2019).
39. Papaemmanuil E. a 26 spoluautorov: *N. Engl. J. Med.* 374, 2209 (2016).
40. Saultz J., Garzon R.: *J. Clin. Med.* 5, 33 (2016).
41. Meggendorfer M., Cappelli L. V., Walter W., Haferlach C., Kern W., Falini B., Haferlach T.: *Leukemia* 32, 1249 (2018).
42. Burnett A. K.: *Hematology 2012* (2012). doi: 10.1182/asheducation-2012.1.1.
43. Popovici-Muller J. a 36 spoluautorov: *ACS Med. Chem. Lett.* 9, 300 (2018).
44. Yen K. a 41 spoluautorov: *Cancer Discov.* 7, 478 (2017).
45. Stein E. M. a 26 spoluautorov: *Blood* 133, 676 (2019).
46. Fan B., Le K., Manyak E., Liu H., Prah M., Bowden C. J., Biller S., Agresta S., Yang H.: *Blood* 126, 1310 (2015).
47. DiNardo C. D. a 39 spoluautorov: *N. Engl. J. Med.* 378, 2386 (2018).
48. Fan B. a 15 spoluautorov: *Invest. New Drugs* 38, 2 (2020).
49. Godel M., Ortone G., Anobile D. P., Pasino M., Randazzo G., Riganti C., Kopecka J.: *Pharmaceutic* 13, 762 (2021).
50. Choe S. a 28 spoluautorov: *Blood Adv.* 4, 1894 (2020).
51. Amatangelo M. D. a 17 spoluautorov: *Blood* 130, 732 (2017).
52. Seger R., Krebs E. G.: *FASEB J.* 9, 726 (1995).
53. Stein E. M. a 25 spoluautorov: *Blood* 126, 323 (2015).
54. Harding J. J. a 30 spoluautorov: *Cancer Discov.* 8, 1540 (2018).
55. Intlekofer A. M. a 27 spoluautorov: *Nature* 559, 125 (2018).

V. Vozáriková (*Department of Genetics, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava, Slovakia*): **Oncogenic Forms of Isocitrate Dehydrogenase: Mechanisms of Carcinogenesis and Development of Resistance to Chemotherapeutics**

Many types of tumors harbor a mutation in the gene for the metabolic enzyme isocitrate dehydrogenase resulting in the production of the oncometabolite D-2-hydroxy glutarate with a pleiotropic effect on the cell. The paper provides an overview of the latest knowledge of the mechanism of carcinogenesis, of specific drugs suppressing D-2-hydroxy glutarate production and of the causes of resistance complicating treatment based on specific inhibitors of oncogenic forms of isocitrate dehydrogenase.

Keywords: isocitrate dehydrogenase, oncogenic mutation, D-2-hydroxy glutarate, chemotherapy, resistance

- Vozáriková V.: *Chem. Listy* 116, 536–542 (2022).
- <https://doi.org/10.54779/chl20220536>

Acknowledgements

The author wish to thank Prof. RNDr. Lubomir Tomášek, DrSc. For project management, expert consultations, insightful observations, as well as for human participation. This work was supported by the Operational Program Integrated Infrastructure for the project: Advancing University Capacity and Competence in Research, Development and Innovation, ITMS2014+:313021X329, co-financed by the European Regional Development Fund and grants from the Agency for Science and Research Support (APVV-19-0068), VEGA (1/0061/20) and Comenius University in Bratislava (UK / 145/2021).