

Inhibitory proteazomového systému v léčbě MDS

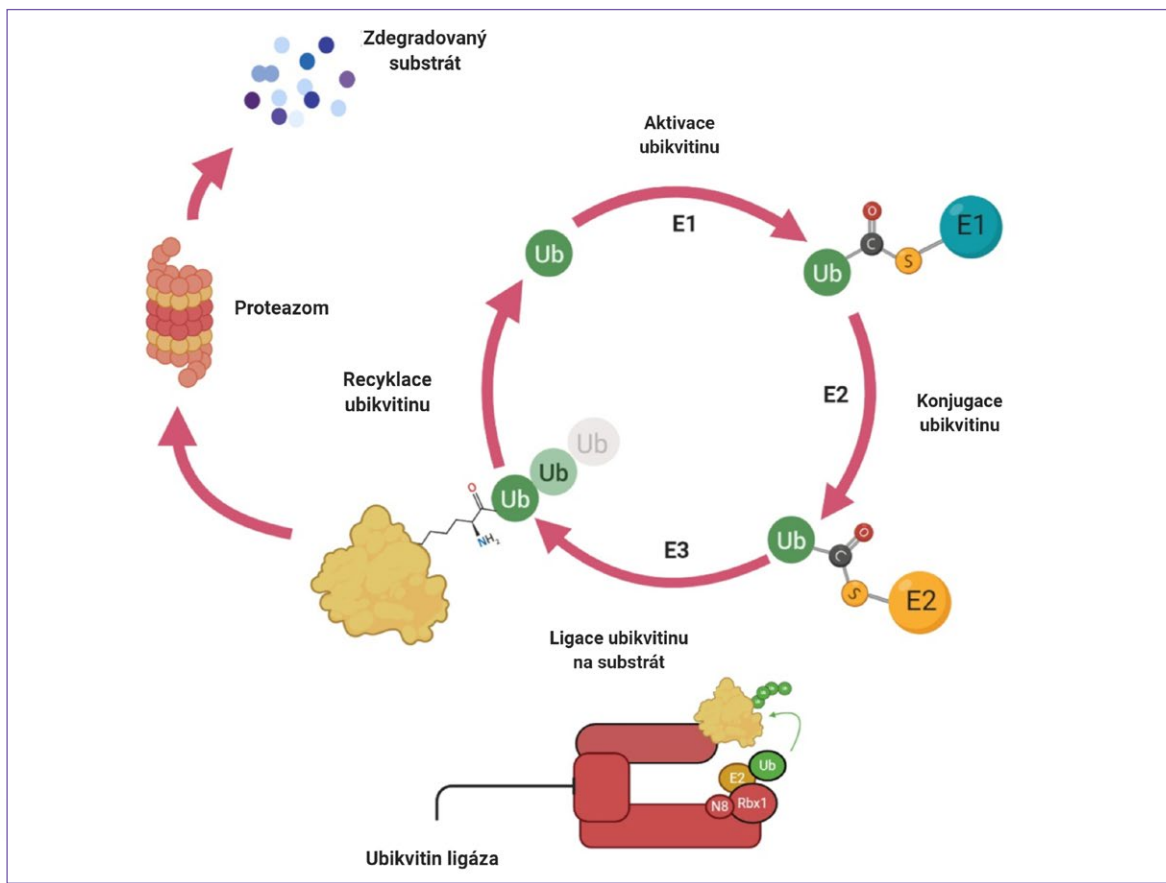
| Lukáš Čermák, Nikol Baloghová, Tomáš Liďák

Oddělení nádorové biologie, Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i., Praha

Ubikvitin-proteazomový systém (UPS) je komplexní buněčný mechanismus, kterým buňky odstraňují nepotřebné a poškozené proteiny (1, 2). Tento mechanismus se účastní téměř všech vývojových a homeostatických procesů a je nezbytný zejména pro dynamické a cyklické procesy, jako je

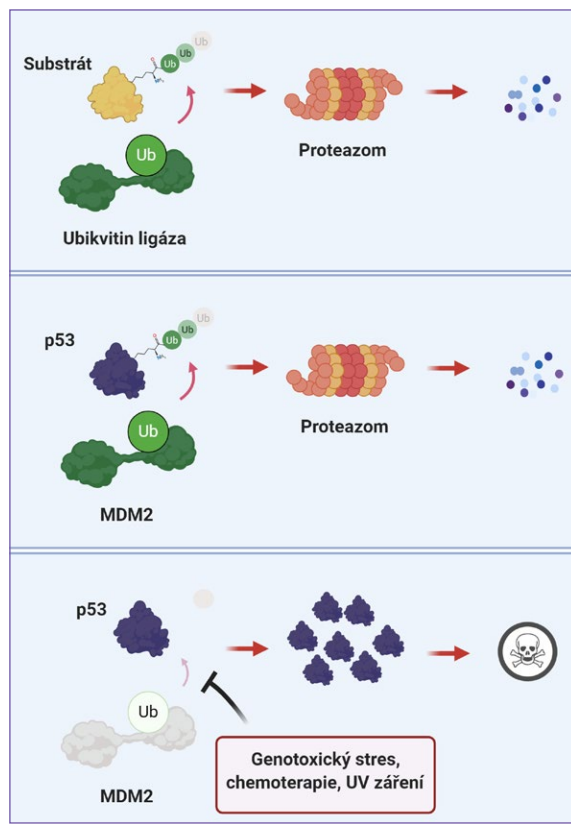
buněčná odpověď na stres, buněčný cyklus či imunitní odpověď. UPS je tvořen kaskádou enzymatických reakcí, které umožňují označení specifického proteinu pomocí krátkého peptidu zvaného ubikvitin (obrázek č. 1). Specificita této reakce je dána enzymem E3, jinak také zvaného ubikvitin

Obrázek č. 1: Ubikvitin proteazomový systém (UPS) slouží k identifikaci a označení nepotřebných a poškozených proteinů pomocí malého peptidu ubikvitinu. Recyklováný nebo *de novo* produkovaný ubikvitin je pomocí koordinované akce třech enzymů, E1, E2 a E3, kovalentně připojen k substrátu. Takto označený substrát je následně rozeznán proteazomem a degradován.



Zdroj: Archiv autorů

Obrázek č. 2: Ubikvitin ligázy specificky rozeznávají substráty UPS systému. Typickým příkladem je MDM2 ubikvitin ligáza zodpovědná za degradaci tumor supresorového proteinu p53. Tato ligáza, jejíž akce je schematicky naznačena v prostředním diagramu, je v důsledku genotoxického stresu blokována. V takovém případě dochází ke stabilizaci p53 a aktivaci cytostatického a apoptického programu.



Zdroj: Archiv autorů

ligáza (3). Tento enzym propojuje dvě základní entity UPS – rozeznání specifického proteinu a jeho označení pomocí ubiquitinu (obrázek č. 2). Označený protein je následně transportován do proteazomu, ve kterém je rozštěpen, a nakonec degradován na malé peptidy až aminokyseliny. Typickým příkladem takových ubikvitin ligáz jsou mnohahodnotkové RING (really interesting new gene) ubikvitin ligázy (4). Tyto ligázy ve své struktuře obsahují strukturní protein cullin, který je zodpovědný za koordinaci ubiquitinačního procesu a specifické selekce cílových proteinů – substrátů. Ubikvitin ligázy jsou nezbytné pro specifickou degradaci tisíců lidských proteinů a regulaci většiny buněčných procesů. Esenciální role těchto proteinů u nádorových onemocnění je cílem vývoje mnoha chemoterapeutik (5). V poslední době se ukázalo, že dvě takové látky jsou účinné v léčbě pacientů s myelodysplastickým syndromem (MDS).

Jedná se o lenalidomid, který je účinný u nízkorizikových nemocných s MDS majících delecí dlouhého raménka 5. chromozomu (5q-syndrom), a o pevonedistat, který je v současnosti testován na pacientech s vysoce rizikovým MDS léčených azacitidinem (6, 7).

Lenalidomid

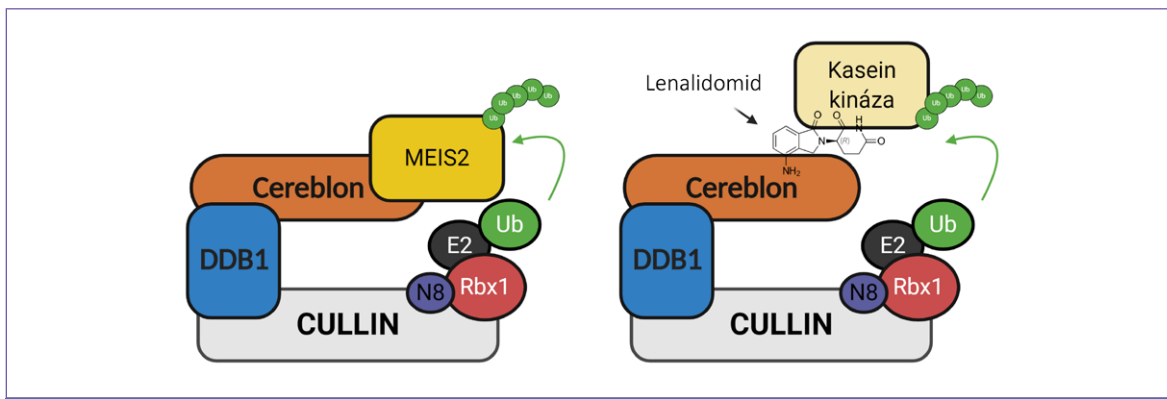
Lenalidomid byl identifikován jako vysoce efektivní chemoterapeutikum pro podtyp MDS charakterizovaný delecí části dlouhého ramene chromozomu 5 (8). Tento "indolentní," typ MDS se označuje jako 5q-syndrom a projevuje se makrocytickou anémií s mírnou trombocytémií. Dále je efektivní pro některé pacienty s RARS-T (nízkorizikový MDS s prstenčitými sideroblasty a trombocytémií). Pro ostatní pacienty s nízkorizikovým MDS je lenalidomid významně méně účinný.

Průlomová studie léčby MDS pomocí lenalidomidu zahrnovala 43 pacientů s transfuzní závislostí či symptomatickou anémií. Všichni pacienti byli refrakterní vůči EPO nebo měli vysoké hladiny endogenního EPO. Výsledky této studie ukázaly potenciál lenalidomidu u pacientů s del (5q) MDS, kteří neodpověděli na léčbu erythropoetinem, ale ukázaly i na možnou roli lenalidomidu u EPO refrakterních non-del (5q) MDS pacientů. 83% pacientů s del (5q) MDS vykazovalo signifikantní erytroidní odpověď definovanou jako trvalá nezávislost na transfuzi, ve srovnání s 53% pacientů s normálním karyotypem a 12% pacientů s jinými abnormalitami karyotypu. Tato iniciální studie vedla ke dvěma následujícím klinickým studiím, ve kterých byla potvrzena účinnost lenalidomidu u pacientů s del (5q) MDS (6). Léčba pomocí lenalidomidu nevyšla riziko progresse AML a prodloužila délku přežití u transfuzně závislých pacientů s nízkorizikovým del (5q) MDS.

Lenalidomid je analog thalidomidu. Tento perorálně podávaný imunomodulátor potlačující růst cév, s protinádorovými, protizánětlivými vlastnostmi, jenž podporuje červenou krvetvorbu, byl vyvinut ve snaze zabránit vedlejším účinkům thalidomidu a zvýšit jeho účinnost (9). Lenalidomid je thalidomidu strukturálně i biologicky podobný. Lenalidomid zvyšuje aktivitu a počty T-lymfocytů, NK-buněk a tzv. NK-T-buněk (10). Jeho protizánětlivé účinky jsou zprostředkovány inhibicí tumor nekrotizujícího faktoru α a aktivací protizánětlivého interleukinu 10 (11).

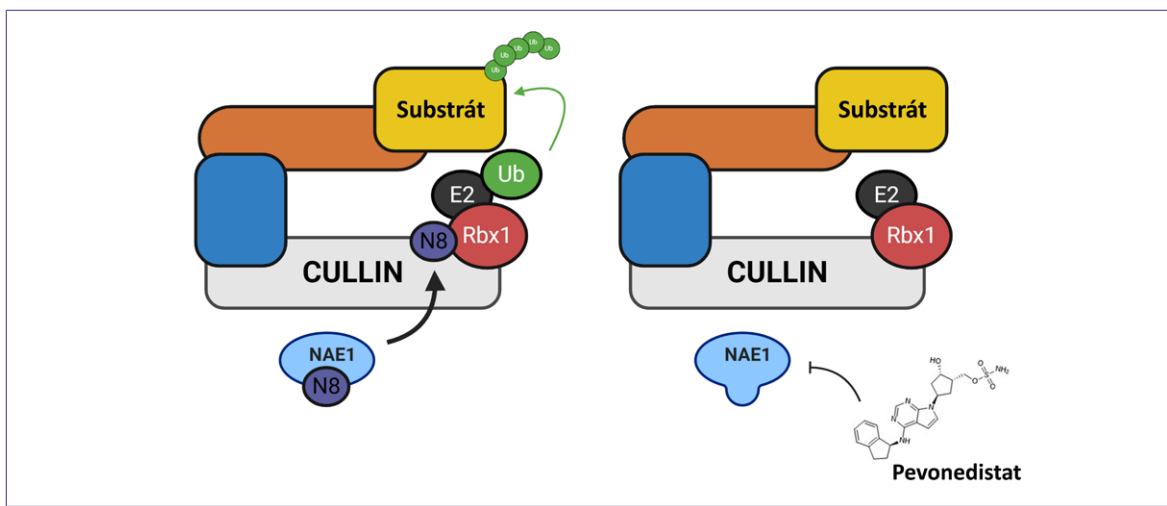
Mechanisticky působí lenalidomid podobně jako jeho příbuzná imunomodulační (IMiD) činidla thalidomid a poma-

Obrázek č. 3: Mechanismus působení lenalidomidu: lenalidomid se váže na substrátový adaptor cereblon a mění jeho vazebnou specifitu. Taková ubikvitin ligáza pak rozeznává *de novo* substráty a degraduje je.



Zdroj: Archiv autorů

Obrázek č. 4: Mechanismus působení pevonedistatu: pevonedistat blokuje enzym NAE1. Tento enzym je nezbytný pro aktivaci ubikvitin ligáz závislých na cullinu.



Zdroj: Archiv autorů

lidomid (obrázek č. 3) (12). Všechny tyto látky se vážou na protein cereblon (13). Ten slouží jako substrátový adaptér pro ubikvitin ligázy s mnoha podjednotkami. Cereblon za normálních podmínek rozeznává své endogenní substráty, jako je například protein Meis2, který se účastní vývoje končetin (14). Po vazbě cereblonu na IMiDová činidla dochází ke změně jeho vazebných schopností. Zatímco vazba jeho přirozených partnerů je potlačena, nově dochází k vazbě tzv. „nepřirozených“ partnerských bílkovin, které jsou označeny ubikvitinem a následně degradovány. Takovým novým partnerem je např. Sall4, transkripční faktor, jehož nepřirozená degradace měla za následek vývojové defekty u dětí narozených matkám, které během těhoten-

ství užívaly thalidomid (15). Dalšími z takto rozeznávaných proteinů jsou lymfoidní transkripční faktory IKZF1 a IKZF3, jejichž degradace má klinický význam v léčbě mnohočetného myelomu (16).

U MDS s del (5q) se původně cytotoxický účinek lenalidomidu přisuzoval regulaci tumor supresorového proteinu p53 a modifikaci mikroprostředí kostní dřeně (17). Přelomová studie ale ukázala, že hlavním cílem lenalidomidu je indukce ubikvitinace a degradace bílkoviny kasein kináza 1 (CK1α) (18). Zmíněný enzym je kódován v oblasti 5q a v buňkách MDS s delecí v této oblasti je exprimován pouze z jedné (tedy nedeletované) kopie chromozomu 5. To činí

buňky u MDS s del (5q) extrémně citlivé k inhibici CK1 α . Po inaktivaci CK1 α v buňkách MDS dochází k následné aktivaci tumor supresoru p53 a k indukci apoptického programu a buněčné smrti. Nejnovější zjištění ukazují, že tento proces je závislý na předešlé diferenciaci MDS buněk a tato diferenciace je řízená dalším „nepřirozeným“ substrátem cereblonu – transkripčním faktorem IKZF1 (19).

Pevonedistat

Zatímco výše uvedený lenalidomid působí skrze změnu vazebných vlastností proteinu cereblonu, jiné skupiny látek umožňují blokovat celý UPS nebo jeho významné součásti. Jednou z takových látek je pevonedistat, který inhibuje NEDD8-aktivační enzym (NAE; obrázek č. 4), jenž je nezbytný pro ubikvitinaci proteinů skrze cullin-závislé ubikvitin ligázy (21, 22). Inhibice NAE pomocí pevonedistatu interferuje s ubikvitinací a degradací proteinů v proteozomu a vede k akumulaci substrátů těchto ligáz. Kombinace pevonedistatu (PEV) s azacitidinem (AZA) – PevAz – vedla k synergickému odstraňování buněk MDS *in vitro* a též i v myších xenograftových modelech akutní myeloidní leukemie (AML) (7, 23). V současné době probíhá několik studií zkoumajících vliv této kombinace na pacienty. PevAz se zdá být dobře tolerován u pacientů s MDS, u kterých dříve selhala léčba pomocí inhibitorů DNA methyltransferáz (DNMTi). U těchto pacientů, jejichž možnosti léčby jsou omezené a prognóza velmi špatná, jsou předběžné výsledky obzvláště povzbudivé.

Budoucnost léčby MDS pomocí inhibitorů UPS

Výše zmíněné látky, lenalidomid a pevonedistat, mají významný potenciál v budoucnosti léčby MDS. Jejich využití bude přímo úměrné tomu, jak dokážeme odhadnout odpověď pacientů na tuto léčbu. Je proto nezbytné identifikovat faktory, které ji ovlivňují a mohou představovat potenciální biomarkery využitelné v diagnostice. Naše laboratoř se v současnosti podílí na analýze vlivu pevonedistatu a azacitidinu na MDS buňky ve spolupráci s výzkumnými týmy 1. LF UK a VFN v Praze. Pomocí proteomických a genetikých studií se snažíme odhalit spektrum proteinů, které jsou přímo ovlivněny působením pevonedistatu. Jedná se nám o výzkum jak ubikvitin ligáz, jejichž akce je inhibová-

na, tak o výzkum jejich substrátů které jsou v důsledku této inhibice stabilizovány a jejichž funkce je přímo provázána s cytostatickými účinky tohoto farmaka. Zároveň se snažíme odhalit genetické faktory zodpovědné za potenciální lékovou rezistenci na pevonedistat. Tyto experimenty by měly vést k identifikaci biomarkerů využitelných k efektivní léčbě nádorového onemocnění.

Grantová podpora: GAČR 18-27408S; GAČR 19-03586S

Mgr. Lukáš Čermák, Ph.D., Mgr. Nikol Baloghová,
Mgr. Tomáš Lidák

Oddělení nádorové biologie, Ústav molekulární genetiky AV
ČR, v. v. i., Praha
e-mail: lukas.cermak@img.cas.cz

Literatura

1. Bassermann F, et al. *Biochimica et biophysica acta* 2014; 1843: 150–162.
2. Nalepa G, et al. *Nature reviews. Drug discovery* 2006; 5: 596–613.
3. Cardozo T, et al. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 739–751.
4. Liu L, et al. *Oncogene* 2018; 37: 148–159.
5. Bulatov E, et al. *Front Pharmacol* 2018; 9: 450.
6. Stahl M, et al. *Cancer* 2017; 123: 1703–1713.
7. Swords RT, et al. *British journal of haematology* 2015; 169: 534–543.
8. List A, et al. *The New England journal of medicine* 2005; 352: 549–557.
9. Crane E, et al. *Cancer investigation* 2005; 23: 625–634.
10. Hsu AK, et al. *Blood* 2011; 117: 1605–1613.
11. Shaim H, et al. *Frontiers in immunology* 2017; 8: 1773.
12. Zhu YX, et al. *Leukemia & lymphoma* 2013; 54: 683–687.
13. Ito T, et al. *Science* 2010; 327: 1345–1350.
14. Fischer ES, et al. *Nature* 2014; 512: 49–53.
15. Donovan KA, et al. *Elife* 2018; 7.
16. Kronke J, et al. *Science* 2014; 343: 301–305.
17. Wei S, et al. *Oncogene* 2013; 32: 1110–1120.
18. Kronke J, et al. *Nature* 2015; 523: 183–188.
19. Paiva B, et al. *Leukemia* 2017; 31: 382–392.
20. Gil-Perez A, et al. *Therapeutic advances in hematology* 2019; 10: 2040620719847059.
21. Hori T, et al. *Oncogene* 1999; 18: 6829–6834.
22. Brownell JE, et al. *Mol Cell* 2010; 37: 102–111.
23. Swords RT, et al. *Blood* 2018; 131: 1415–1424.