

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů
Studijní obor: Speciální chemicko-biologické obory



Magdalena Poukarová

Protein MTH,
role v nádorových buňkách a využití v protinádorové terapii

MTH1 protein,
its role in cancer cells and targeting in anticancer therapy

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Tereza Ormsby, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 5.6. 2020

Podpis

Poděkování:

Chtěla bych především poděkovat své školitelce Mgr. Tereze Ormsby, Ph.D. za vstřícnost, trpělivost, mnoho cenných rad a postřehů, kterými mi po celou dobu psaní velmi pomáhala. Moc si vážím ochoty a času, který mi při psaní práce věnovala.

Poděkování patří také Doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc. za příležitost pracovat v laboratoři pod jeho vedením.

Abstrakt

MTH1 je protein patřící do rodiny NUDIX hydroláz. Pomáhá rakovinným buňkám vyrovnat se s oxidativním stresem způsobeným nádorovou transformací. Hydrolyzuje oxidované formy deoxyribonukleotidtrifosfátů (dNTP) čímž buňku chrání před vznikem mutací, pomáhá zachovat genomovou integritu a předejít senescenci a buněčné smrti. Na rozdíl od rakovinných buněk, pro které je jeho aktivita esenciální, je ve zdravých buňkách jeho exprese velmi nízká. Proto se o něm začalo uvažovat jako o potenciálním terapeutickém cíli pro léčbu rakoviny. Bylo vyvinuto několik generací inhibitorů. Výsledky testování jejich protinádorové aktivity byly ale často protichůdné. Cílem této práce bude přiblížit funkci MTH1 proteinu, jeho roli v rakovinných buňkách a popsat cestu, která vedla ke vzniku úspěšných inhibitorů.

Klíčová slova: MTH1, rakovina, oxidativní stres, 8-oxo-dGTP, inhibitory MTH1

Abstract

MTH1 is a protein belonging to the NUDIX hydrolase family. It helps cancer cells to cope with oxidative stress caused by tumor transformation. MTH1 hydrolases oxidized forms of deoxyribonucleotidetriphosphates (dNTPs), thus protects the cell from mutations, helps to maintain genomic integrity and prevents senescence and cell death. Unlike cancer cells, for which MTH1 activity is essential, its expression is very low in healthy cells. Therefore, MTH1 was considered as a potential therapeutic target for the cancer treatment. Several generations of MTH1 inhibitors have been developed. However, the results of testing their anticancer activity were often contradictory. The aim of this work will be to show the function of MTH1 protein, its role in cancer cells and to discuss the path that led to the development of successful inhibitors.

Key words: MTH1, cancer, oxidative stress, 8-oxo-dGTP, MTH1 inhibitors

Seznam použitých zkratek

Δ mutT	MTH1 deficiencie (E. coli)
\bullet O ₂ ⁻	superoxidový radikál
¹ O ₂	singletový kyslík
2-OH-dATP	2-Hydroxy-2'-deoxyadenosin-5'-trifosfát
53BP1	p53-binding protein 1
8-oxo-dATP	8-Hydroxy-2'-deoxyadenosine-5'-triphosphate
8-oxo-dGTP	7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxy-guanosin-5'-trifosfát
8-oxo-GMP	7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxy-guanosin-5'-monofosfát
A	adenin
ADK	adenosine kinase
AP-1	activator protein 1
APE1	apurinic endonuclease 1
ARE	antioxidant respose element
ARGO	ATP-releasing guanine-oxidized
ATP	adenosintrifosfát
BER	base excision repair
C	cytosin
CAT	kataláza
CDKN1A	cycline dependent kinase inhibitor 1A
CETSA	cellular thermal shift assay
DDR	DNA damage response
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleosidtrifosfát
EGF	epidermal growth factor = epidermální růstový faktor
EMT	epitelo-mezenchymální tranzice
ETC	electron transport chain = elektronový transportní řetězec
EXO1	endonukleáza 1
FBS	fragment based screening
G	guanin
GAP	GTPase-activating proteins
GEF	guanine nucleotide exchange-factors

GPCR	G protein-coupled receptor
GPX	glutathion peroxidáza
gRNA	guide RNA
GSH	glutathion
GSSG	glutathion disulfid
GSTA2	glutathione S-transferase A2
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HGF	hepatocyte growth factor
HIF1- α	hypoxia-inducible factor 1-alpha
hMTH1	human MTH1
HTS	High-throughput screening
IDL	insertion deletion loops
IL-10	interleukin-10
IL-2	interleukin-2
IL-6	interleukin-6
KD	knock-down
KO	knock-out
MMR	mismatch repair
MSI	mikrosatelitní DNA
MTH1	MutT homolog 1
MUTYH	MutY DNA glykosyláza
NF- κ B	nukleární faktor kapa B
NMR	nukleární magnetická rezonance
NOX	NADPH oxidáza
NQO1	NADPH quinone oxidoreductase 1
NRF2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NUDIX	nucleoside diphosphates linked to moiety-X
O ₃	ozon
OGG1	8-Oxoguanin DNA glykosyláza
OH \cdot	hydroxylový radikál
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PDGF	platelet derived growth factor
PHA	fytohemaglutinin
Pol β	polymeráza beta

Pol δ	polymeráza delta
RNAi	RNA interference
ROS	reactive oxygen species = reaktivní formy kyslíku
SAC	spindle assembly checkpoint
SAR	structure-activity relationship
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SOD	superoxid dismutáza
T	thymin
TGF β 1	transforming growth factor beta 1
TNF α	tumor necrosis factor alpha
USP28	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 28
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VHL	Von Hippel Lindau tumor suppressor
WT	wild-type
zfMTH1	zebrafish MTH1

Obsah

1	Úvod	9
2	Reaktivní formy kyslíku (ROS)	10
2.1	Vznik ROS	10
2.2	Antioxidanty	11
2.3	ROS a buněčná signalizace.....	11
2.4	ROS a rakovina.....	12
3	ROS a poškození buňky	13
3.1	Poškození DNA	13
3.2	Opravné mechanismy oxidovaných bází v DNA.....	14
3.2.1	Base excision repair (BER, oprava vystřížením poškozené báze).....	14
3.2.2	Mismatch repair (MMR, oprava chybného párování bází).....	15
4	NUDIX hydrolázy	15
4.1	MTH1 (MutT homolog-1)	16
4.1.1	Enzymatická aktivita MTH1.....	17
4.1.2	Expres MTH1	18
4.1.3	Nadměrná exprese MTH1 v rakovinných buňkách	19
4.1.4	Spontánní tumorigeneze <i>Mth1</i> ^{-/-} myši.....	20
4.1.5	Role MTH1 a dalších opravných mechanismů v senescenci.....	20
4.1.6	Role MTH1 v RAS-indukovaných nádorech	21
5	MTH1 jako potenciální terapeutický cíl	22
5.1	První generace inhibitorů MTH1	23
5.2	Další inhibitory MTH1	26
5.3	Dvojitý účinek TH287, TH588 a TH1597	30
6	Závěr	37
7	Seznam použité literatury	38

1 Úvod

Rakovinné buňky vykazují zvýšenou hladinu reaktivních forem kyslíku (ROS), které jsou generovány v důsledku vysoké aktivity mitochondrií, kde probíhá elektron-transportní řetězec. ROS se z něj snadno uvolňují, a mitochondrie se tak stává jejich hlavním zdrojem. Významné množství ROS vzniká také působením některých onkogenů. ROS jsou v nízké koncentraci důležité pro regulaci fyziologických funkcí. Mají vliv na genovou expresi a buněčnou smrt. Při imunitních reakcích jsou zdrojem oxidativního vzplanutí. Slouží mimo jiné jako molekuly signální transdukce. Některé tyto signální dráhy zajišťují rakovinné buňce značné proliferační výhody. Na druhou stranu ROS způsobují oxidativní poškození makromolekul, včetně DNA a jejich prekurzorů deoxyribonukleosidtrifosfátů (dNTP). Inkorporace oxidovaných forem dNTP vede ke vzniku mutací, senescenci a buněčné smrti. Buňky vyvinuly mnoho mechanismů, jak se před oxidativním poškozením chránit. Jedním z nich je eliminace oxidací poškozených dNTP, což zajišťuje např. protein MTH1. Katalyzuje hydrolýzu hlavního produktu oxidace dNTP, 8-oxo-dGTP, který se v DNA nesprávně páruje s adeninem a způsobuje G->T transverzi. Dalšími substráty MTH1 jsou 8-oxo-GTP, 2-OH-dATP, 2-OH-ATP, 8-oxo-dATP a 8-oxo-ATP, jejichž hladina v buňce je oproti 8-oxo-dGTP méně významná. Produktem MTH1 katalyzované reakce oxidovaných dNTP je dNMP, který už nemůže být do nascentního vlákna DNA zařazen. Rakovinné buňky v porovnání se zdravými exprimují MTH1 v mnohem větší míře. Jeho aktivita je pro ně esenciální, což vedlo k nápadu využít ho jako cíl protinádorové léčby. V roce 2014 byly publikovány dva inhibitory MTH1, které měly na rakovinné buňky cytotoxický efekt. To vzbudilo o MTH1 velký zájem. Později byly syntetizovány další série inhibitorů MTH1, které vyvolaly velkou míru kontroverze. Některé z nich totiž i přes svůj velký inhibiční potenciál nezpomalily růst a proliferaci rakovinných buněk, což vneslo pochyby do původní hypotézy, že inhibice MTH1 je pro rakovinné buňky smrtelná. Dalším studiem bylo zjištěno, že inhibitory první generace působí dvojím účinkem, jednak inhibují MTH1 a zároveň negativně ovlivňují polymeraci mikrotubul, čímž prodlužují mitózu.

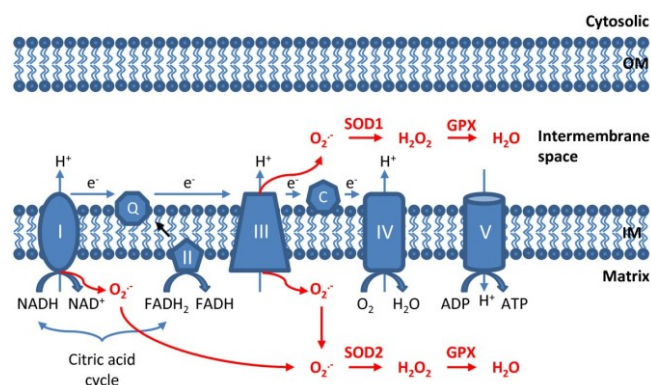
2 Reaktivní formy kyslíku (ROS)

ROS, neboli reaktivní formy kyslíku, je obecný název skupiny vysoce reaktivních molekul obsahujících kyslík. Patří do ní superoxid ($\bullet\text{O}_2^-$), peroxid vodíku (H_2O_2), hydroxylový radikál ($\text{OH}\cdot$), singletový kyslík ($^1\text{O}_2$), ozon (O_3), alkoxylový radikál, peroxyinitrit, peroxylový radikál a další. ROS zahrnují volné radikály, ale i reaktivní formy kyslíku, které volnými radikály nejsou. Při nízké hladině sehrávají důležitou fyziologickou funkci v redoxní signalizaci a imunitní odpovědi, vysoká hladina ROS je pak příčinou oxidativního stresu za patologických podmínek v buňce a vede k četným poškozením buněčných komponent (Li and Trush, 2016). ROS vznikají buď jako vedlejší produkt reakcí nebo jako reakce buňky na xenobiotika či cytokiny.

2.1 Vznik ROS

ROS jsou v buňce tvořeny buď endogenně nebo exogenně. Exogenním zdrojem může být např. radiační záření, těžké kovy, kouření, léky, strava nebo znečištěné prostředí. K endogennímu vzniku dochází při biochemických reakcích probíhajících převážně v mitochondriích, peroxisomech nebo endoplazmatickém retikulu (Bhattacharyya et al., 2014). V mitochondriích probíhá postupná oxidace redukovaných koenzymů v elektrotransportním řetězci (ETC). Tím se koenzymy recyklují a protony se uvolňují do mezimembránového prostoru. Na konci řetězce dochází na ATP syntáze k syntéze ATP, která je řízena protonovým gradientem produkovaným ETC. Elektron se může během ETC uvolnit (převážně z komplexů I a III) a redukovat O_2 , čímž vzniká superoxidový radikál ($\bullet\text{O}_2^-$) (Obrázek 1). Ten je prekurzorem většiny dalších ROS a zdrojem řetězové reakce (Turrens, 2003).

Dalším místem vzniku ROS molekul jsou NADPH oxidázy (NOX), které přesouvají elektron z NADPH na molekulu kyslíku za vzniku superoxidu (Bedard and Krause, 2007).

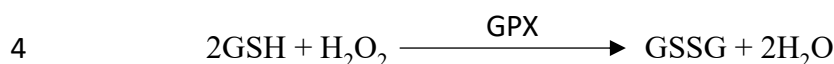
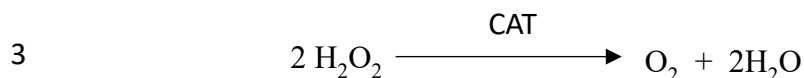
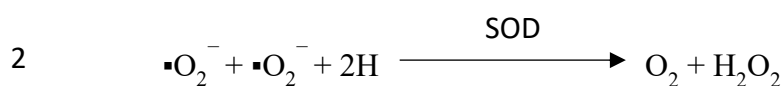


Obrázek 1

K úniku mitochondriálních ROS dochází na I. a III. komplexu ETC. Uvolněný elektron redukuje kyslík, čímž vzniká superoxid. Superoxid dismutázou je superoxid v mitochondriální matrix (SOD2) nebo v mezimembránovém prostoru (SOD1) přeměněn na peroxid vodíku, případně je dále zneškodněn glutathion peroxidázou na vodu. Převzato z (Li et al., 2013).

2.2 Antioxidanty

Antioxidanty eliminují hladinu ROS přeměnou na málo reaktivní molekuly, a tím buňku chrání před poškozením (viz kapitola 13). Jsou jimi např. SOD (superoxid dismutáza), CAT (kataláza), GPX (glutathion peroxidáza). Superoxidový radikál je sám o sobě středně reaktivní, ale Haber-Weissovou reakcí (1) s peroxidem vodíku vzniká vysoce reaktivní hydroxylový radikál, který má velký ničivý potenciál. Metaloprotein SOD (2) eliminuje množství $\bullet\text{O}_2^-$ jeho přeměnou na peroxid vodíku a kataláza (3), případně glutathion peroxidáza (4) katalyzují přeměnu peroxidu vodíku na vodu. Glutathion peroxidáza vyžaduje glutathion (GSH) v redukované formě. To zajišťuje glutathion reduktáza, která přenáší protony z NADPH na oxidovaný glutathion GSSG (glutathion disulfid) (5) (He et al., 2017).



(Stone et al., 2020)

2.3 ROS a buněčná signalizace

ROS slouží jako regulátory některých transkripčních faktorů důležitých pro adhezi, proliferaci, diferenciaci, angiogenezi, antiapoptickou signalizaci, EMT (epitelo-mezenchymální tranzici), řízení imunitní odpovědi, senescenci či apoptózu. Udržování jejich hladiny v rovnováze je nezbytnou podmínkou pro zdravé fungování buňky.

Sehrávají důležitou roli v signalizaci jakožto druzí posli (second messenger molekuly). Oxidují SH skupinu protein kináz, čímž je aktivují a tím spouští různé signální dráhy (Zhang et

al., 2016). Transkripční faktor NF- κ B účastní se regulace mnoha buněčných procesů, včetně vrozené imunity, ale i kontroly buněčného přežití, je prostřednictvím ROS aktivován (Schreck et al., 1991). NF- κ B zároveň zvyšuje expresi antioxidantů, čímž je pak hladina ROS opět snížena (Morgan and Liu, 2011). ROS dále aktivují EGF (epidermal growth factor) a PDGF (platelet-derived growth factor) receptory, čímž stimulují RAS protein a spouští MAPK/ERK dráhu důležitou v procesu buněčného dělení. Jako regulátor oxidativního stresu slouží NRF2, který udržuje hladinu ROS v rovnováze (Zhang et al., 2016). Při vyšší koncentraci je NRF2 aktivován a přesouvá se do jádra, kde se váže na sekvence ARE (antioxidant response element) (Itoh et al., 1999) v upstream promotorové oblasti genů, např. GSTA2 (glutathione S-transferase A2) a NQO1 (NADPH quinone oxidoreductase 1), nezbytných pro detoxifikaci ROS (Nguyen et al., 2009).

ROS mohou aktivovat vápníkové kanály a zvyšovat tak hladinu vápenatých iontů (Ca^{2+}) v buňce. Vápenaté ionty hrají významnou roli v mnoha buněčných procesech jako tzv. druží posli. Mimo jiné třeba aktivují NOX, čímž pozitivně regulují další vznik ROS (Görlach et al., 2015). S NOX jsou asociovány membránové receptory některých intracelulárních růstových faktorů a cytokinů (např. TGF β 1 nebo HGF) nebo extracelulárních růstových faktorů (např. PDGF, HGF, insulin, VEGF, TNF α , VCAM-1) (Wu, 2007).

2.4 ROS a rakovina

V rakovinných buňkách je narušena regulace hladiny ROS. Rychlejší dělení je energeticky náročné, proto rakovinné buňky zvyšují svůj mitochondriální metabolismus, a tím produkují více ROS, které unikají mitochondriálními póry do cytosolu. Zároveň jsou generovány v důsledku nadměrné aktivace řady onkogenů a hypoxie, která je s nádorovým onemocněním spojená. Rakovinné buňky jsou tedy neustále vystavovány oxidativnímu stresu, který spouští některé signální dráhy (viz. ROS a buněčná signalizace) přispívající k dalšímu rozvoji nádoru (Weinberg et al., 2019). H_2O_2 slouží jako aktivátor signálních drah, vedoucích např. k EMT. Buňky tak ztrácí svou polaritu a schopnost adheze, což vede k metastázi (Kim et al., 2013). Stimulací transkripčních faktorů VEGF a HIF1- α se spouští signální kaskáda zakončená angiogenezí. ROS nemají signalizační vliv jen v rámci jedné buňky, ale i na celé mikroprostředí nádoru skládající se z širokého spektra různých buněk (vaskulární, imunitní, stromální buňky). Rakovinná buňka uvolňuje ROS do okolí nádoru, kde ovlivňuje funkci dalších buněk, které pak např. uvolňují signální molekuly přispívající k angiogenezi (např. IL-6) či EMT, sekretují

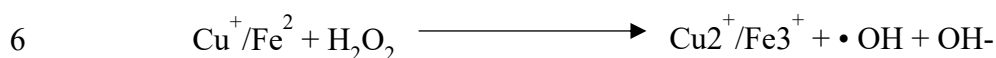
antiapoptické faktory, chemokiny a interleukiny inhibující imunitní odpověď (např. IL-10). Vysoká hladina ROS tedy přispívá k nekontrolovanému dělení, zvýšené angiogenezi, metastázám, rezistenci k anoikis a obecně k progresi nádorového bujení (Weinberg et al., 2019).

3 ROS a poškození buňky

Druhou stranou mince ROS je ale jejich vysoká reaktivita. Mitochondriální ROS atakují lipidy mitochondriální membrány, proteiny a DNA, čímž narušují jejich funkci. Když poškození mitochondrie dosáhne určité hranice, spouští se proces apoptózy. Stejně tak poškozuje buněčné komponenty v cytosolu a v jádře (Ott et al., 2007).

3.1 Poškození DNA

Ze superoxidu vzniká peroxid vodíku. Když není včas zachycen antioxidanty, proniká do jádra a tam se Fentonovou reakcí (6) s kovem (převážně mědí a železem) přeměňuje na jednu z nejsilnějších oxidačních molekul – hydroxylový radikál (Wang, 2008).



ROS způsobují kovalentní modifikace DNA, které vedou k poškození bází, jednořetězcovým zlomům, nesprávnému párování a následnému rozvoji rozsáhlých mutací při replikaci (Yu and Anderson, 1997). DNA je ve formě duplexu před oxidativním poškozením relativně chráněna (Kamiya and Kasai, 1995; cit. dle Fouquerel et al., 2016). Její prekurzory, dNTP, ale naopak oxidaci podléhají ve velké míře. Vzhledem k nízkému redoxnímu potenciálu je guanin obzvláště náchylný na oxidativní poškození. Dává vzniknout různým oxidačním produktům, ale nejčastějším a zároveň nejprostudovanějším, je 8-oxo-dGTP (7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxy-guanin), který slouží jako spolehlivý ukazatel oxidativního stresu. V rakoviných buňkách se z důvodu vysoké hladiny ROS toto poškození zvyšuje o dva řády v porovnání se zdravými buňkami za fyziologických podmínek (van Loon et al., 2010). Polymerázy disponují jen malou schopností rozpoznat oxidované dNTP od nepoškozených, důsledkem čehož je snadno inkorporují do DNA (Einolf and Guengerich, 2001). 8-oxo-dG se v *syn* konformaci nesprávně páruje s adeninem v *anti* konformaci. V dalším kole replikace pak dochází k A:T na G:C transverzi. Tato mutace se konzervuje v dalších generacích, a když není opravena, může vést k rozvoji nádorového onemocnění (Culp et al., 1989).

3.2 Opravné mechanismy oxidovaných bází v DNA

S vyšším oxidativním stresem narůstá množství 8-oxo-dGTP, který je při replikaci inkorporován do nascentního vlákna DNA s vyšší frekvencí než za fyziologických podmínek. To způsobuje rozsáhlé mutace, které vedou k DDR (DNA damage response, buněčná odpověď na poškození DNA), senescenci a buněčné smrti (Rai et al., 2009). Buňky si vyvinuly ochranná opatření; např. exprimují proteiny, které oxidací poškozené, genomové nukleotidové báze rozpoznávají a napomáhají jejich výměně za nukleotidy nepoškozené. Dále zvyšují expresi proteinů, které oxidované formy dNTP odbourávají. Tím snižují negativní dopad oxidativního stresu na genomovou stabilitu buňky. Mezi tyto enzymy patří také MTH1 (MutT homolog 1) (viz kapitola 4.1) (Rudd et al., 2016).

3.2.1 Base excision repair (BER, oprava vystřížením poškozené báze)

BER (oprava vystřížením poškozené báze) je buněčný systém nezbytný pro zachování genomové integrity. Opravuje totiž poškození DNA způsobené kromě oxidace také alkylací, deaminací, depurinací a jednovláknovými zlomy. BER dráha probíhá post-replikačně, zahrnuje několik dílčích reakcí, jimiž vznikají meziprodukty, které jsou vzhledem k přítomnosti DNA zlomů stejně nebezpečné, jako původní poškození. Až v posledním kroku dochází k ligaci, a DNA je tak zcela opravena. Proto je důležité, aby tato série reakcí proběhla až do konce. Nejprve dochází k rozpoznání poškození glykosylázami. Pro opravu oxidovaného guaninu jsou jimi OGG1 (8-oxoguanine DNA glycosylase) a MUTYH (MutY DNA glycosylase). Když se v DNA nachází 8-oxo-dG spárován s cysteinem, je rozeznán enzymem OGG1, který odštěpuje oxidovaný guanin. Když se adenin při replikaci nesprávně zařadí proti 8-oxo-G, glykosyláza MUTYH, asociována s PCNA, adenin odštěpí, aby posléze mohl být na jeho místo zařazen cystein. Vzniká tak apurinní místo. To je poté enzymem APE1 (apurinic endonuclease 1) odstraněno a vytváří se tak volný 3' OH a 5' konec pro Pol β (polymeráza beta), která syntetizuje náhradou za vyštěpenou část sekvenci komplementární k opačnému vláknu. Celý proces je zakončen ligací zlomu (nick) pomocí DNA ligázy I/III (Scott et al., 2014).

3.2.2 Mismatch repair (MMR, oprava chybného párování bazí)

Mismatch repair systém, neboli oprava chybného párování bazí, má za úkol během replikace opravovat nesprávně zařazené nukleotidy. Rozpoznává báze poškozené např. oxidací, mezi něž patří i 8-oxo-dG a detekuje smyčky DNA vzniklé inzercí nebo delecí (insertion/deletion loops, IDL), které se nejčastěji objevují v repetitivních oblastech, jako je mikrosatelitní DNA (MSI). IDL vznikají spontánně sklouznutím templátového vlákna během replikace. MMR se skládá z mismatch recognition factors; hMutS α (heterodimer hMSH2/hMSH6) přednostně rozpoznává báze-báze mismatch a oxidované báze, hMutS β (heterodimer hMSH2/hMSH3) umí rozpoznat IDL. Poté exonukleáza (EXO1) odstraní chybu, polymeráza na místo vyštěpené části syntetizuje správnou sekvenci a nakonec ligáza spojuje původní vlákna DNA s novou sekvencí, čímž je oprava dokončena (Li, 2008). MMR hraje roli v odpovědi na oxidativní stres. Po rozpoznání poškození MMR je spuštěna signalizace vedoucí k aktivaci kontrolního bodu buněčného cyklu (cell cycle checkpoint) a prodloužení G2 fáze (G2 arrest). Defekty v některé ze složek MMR vedou ke vzniku spontánních mutací a nestabilitě mikrosatelitních oblastí (Hawn et al., 1995). Oxidativní poškození DNA u organismů s nefunkčním MMR zřejmě napomáhá rozvoji nádorových onemocnění, jako lymfoblastom. *Msh2*^{-/-} (DNA mismatch protein 2) myši vykazují zvýšenou hladinu 8-oxo-G v DNA ve slezině, játrech, srdci, plicích, tenkém střevu a ledvinách. Nádorové onemocnění se však rozvíjí hlavně ve střevech, a zároveň jsou tyto myši náchylné ke vzniku T-buněčného lymfomu, navzdory tomu, že u T-buněk není akumulace 8-oxo-dGTP tak patrná (Russo et al., 2007).


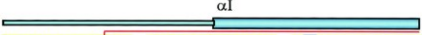


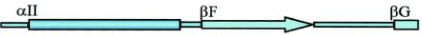

4 NUDIX hydrolázy

NUDIX hydrolázy (nucleoside diphosphates linked to moiety-X) jsou evolučně konzervovaná rodina hydroláz nukleosid-difosfátů, které se řadí mezi tzv. úklidové („house-cleaning“) enzymy. Jejich konzervovaná katalytická sekvence (tzv. NUDIX motiv) obsahuje 23 aminokyselin: GXXXXXEXXXXXXXREUXEEXGU (U značí isoleucin, leucin či valin, X kteroukoli aminokyselinu) (McLennan, 2006). Nachází se v motivu smyčka-helix-smyčka (loop-helix-loop), který je odpovědný za rozpoznávání pyrofosfátu, tedy části substrátu společného pro všechny NUDIX hydrolázy (Srouji et al., 2017). Kofaktorem nezbytným pro katalytickou aktivitu jsou dvoumocné kationty, nejčastěji Mg²⁺. Lidský genom kóduje 24

NUDIX hydroláz, které se liší ve specifitě substrátu (McLennan, 2006). Ta je určena postranními řetězci a motivy mimo katalytickou sekvenci (Carreras-Puigvert et al., 2017).

4.1 MTH1 (MutT homolog-1)

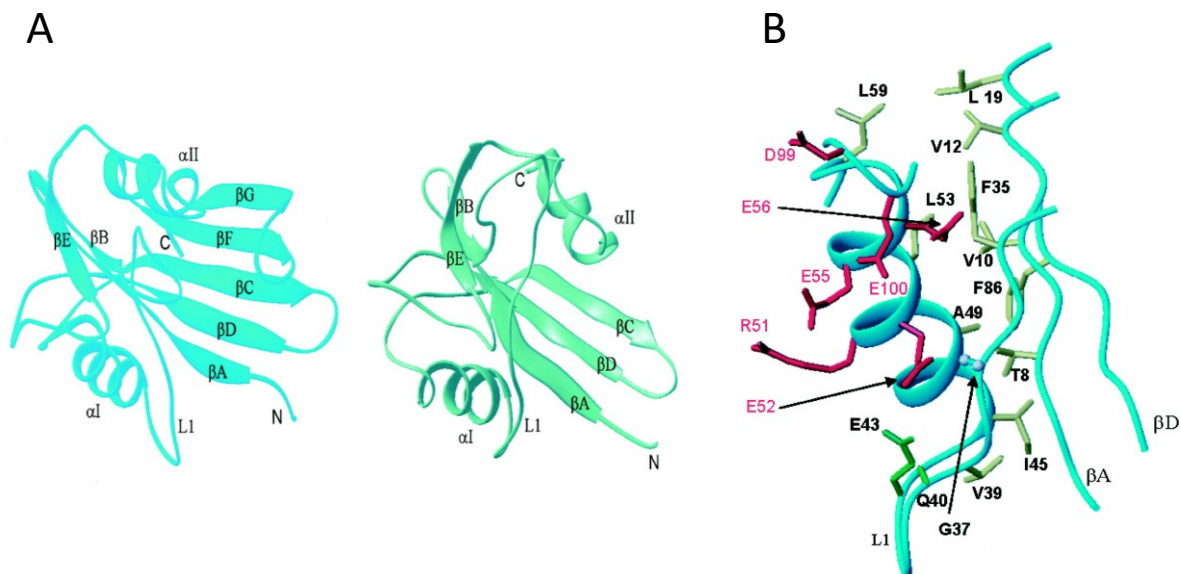
Prvním identifikovanou NUDIX hydrolázou byl MutT exprimovaný *Escherichia coli* (Treffers et al., 1954). Spolu se svým lidským homologem MTH1 je z NUDIX hydroláz nejvíce prostudovaný. Sekvenční shoda MTH1 a MutT je v oblastech mimo NUDIX motiv nízká (Obrázek 2), jejich strukturní podobnost je však vysoká (Obrázek 3A). Struktura NUDIX motivu MTH1 v roztoku byla stanovena pomocí nukleární magnetické rezonance. Skládá se z amfipatického helixu se třemi otkami a ze smyčky, která zaujímá vlásenkovou (hairpin-like) strukturu. Tato smyčka obsahuje β -otčku typu II tvořenou aminokyselinovými zbytky 40-43. Je stabilizována vodíkovou vazbou mezi amidovou skupinou hlavního řetězce Gln⁴⁰ a karboxylové skupiny vedlejšího řetězce Glu⁴³. Gly⁴² a Glu⁴³ jsou konzervovány u všech NUDIX enzymů. β otka je tedy pro aktivitu NUDIX hydroláz zřejmě nezbytná (Obrázek 3B), (Mishima et al., 2004).

		
Human MTH1	MGASRLYTLV LVLQPQRVLL -GMKKRGF-G	28
Mouse MTH1	MSTRLYTLV LVLQPQRVLL -GMKKRGF-G	28
MutT	MK-KLQ IAVG IIRNENNEIF ITRRAADAHM	29
		
Human MTH1	AGRWNGFGGK VQEGETIEDG ARRELQEEESG	58
Mouse MTH1	AGRWNGFGGK VQEGETIEDG AKRELLEESG	58
MutT	ANKLEFPGGK IEMGETPEQA VVRELQEEVG	59
		
Human MTH1	LTVDALHKVG QIVFEFVGEP ELMDVHV FCT	88
Mouse MTH1	LSVDTLHKVG HISFEFVGSP ELMDVHIFSA	88
MutT	ITPQHFSLFE KLEYEFP--D RHITLWFVWL	87
		
Human MTH1	DSIQGTPVES DEMRPCWFQL DQIPFKDMW-	117
Mouse MTH1	DHVHGTPTES EEMRPQWFQL DQIPFADLW-	117
MutT	ERWEGEPWGK EGQPGEWMSL VGLNADDFPP	117
		
Human MTH1	PDDSYWFPLL LQKKKFFHGYP KFGGQDTILD	147
Mouse MTH1	PDDSYWFPLL LQKKKFCGHF KFGDQDTILS	147
MutT	ANEPVIAKLL RL-----	129
		
Human MTH1	YTLREVDTV 156	
Mouse MTH1	YSLREVDVF 156	
MutT	----- 129	

Obrázek 2

Aminokyselinové sekvenční srovnání lidského a myššího MTH1 s *E. coli* MutT. Konzervované aminokyseliny (žlutá), homologní aminokyseliny (šedá), NUDIX motiv (červený rámeček).

Převzato z (Mishima et al., 2004)



Obrázek 3

A Struktura MTH1 (vpravo), MutT (vlevo). Převzato z (Mishima et al., 2004).

B NUDIX motiv MTH1. Konzervované aminokyseliny (červená), Gly³⁷ nezbytný pro katalytickou aktivitu (šedá), hydrofobní aminokyseliny zprostředkující kontakt β A, β D a smyčky 1 (žlutá), Glu⁴³ a Gln⁴⁰ (zelená). Převzato z (Mishima et al., 2004)

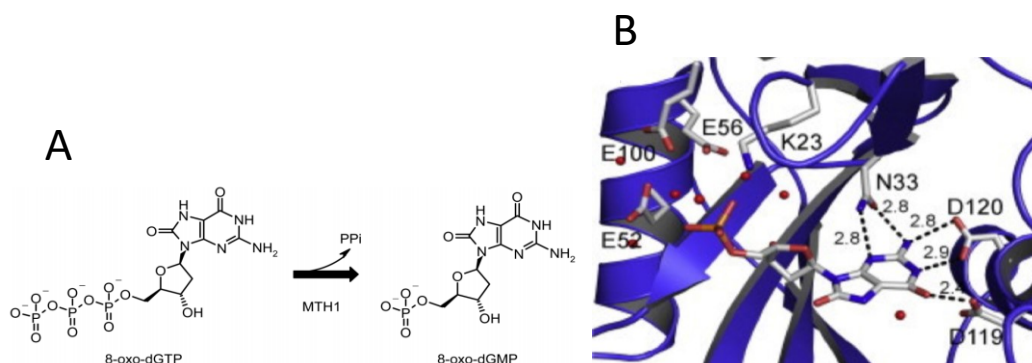
4.1.1 Enzymatická aktivita MTH1

MutT i MTH1 katalyzují hydrolyzu 8-oxo-dGTP na 8-oxo-dGMP (Obrázek 4), který už nemůže být inkorporován do nascentního vlákna DNA, čímž je buňka chráněna před vznikem mutací (Furuichi et al., 1994). Zároveň katalyzují hydrolyzu 8-oxo-GTP na 8-oxo-GMP, a tak snižují inzerci oxidované formy guaninu do RNA. V buňce *E. coli* s nefunkčním genem *MutT* je transverze A:T na C:G o tři řády vyšší, než ve wild-type buňce (Treffers et al., 1954; Yanofsky et al., 1966). Expresí lidské cDNA *MTH1* v *E. coli mutT* dochází k vysoké 8-oxo-dGTPázové aktivitě a frekvence spontánních mutací se významně snižuje, což implikuje, že MTH1 i MutT mají stejnou antimutagení funkci (Sakumi et al., 1993).

MutT má velmi úzkou substrátovou specifitu, štěpí pouze 8-oxo-dGTP a 8-oxo-GTP, zatímco MTH1 hydrolyzuje i další substráty (viz níže). Na otázku, zda tento rozdíl specifit pramení z odlišností v katalytické doméně, odpovídá experiment, při kterém byl vytvořen chimerický hMTH1-Ec. Ten obsahuje sekvenci NUDIX motivu MutT, ale přesto si zachovává svou substrátovou specifitu jako MTH1 enzym. Z toho vyplývá, že rozpoznávání substrátu se odehrává mimo pyrofosfatázovou katalytickou doménu (Sakai et al., 2002).

Kokrystalizací 8-oxo-dGTP s MTH1 bylo zjištěno, že se substrát na protein váže v anti-konformaci. Mg²⁺ tvoří koordinační vazby s trifosfáty substrátu. β -fosfát je atakován vodou a

uvolňuje se pyrofosfát (Obrázek 4A). Po hydrolyze je produkt reakce 8-oxo-dGMP (v případě, že je substrátem 8-oxo-dGTP) vázán v kapse tvořené β -listem a dvěma α -helixy (Obrázek 4B), (Svensson et al., 2011).



Obrázek 4

A Hydrolyza 8-oxo-dGTP katalyzovaná enzymem MTH1. Převzato z (Papeo, 2016).

B Vazba produktu enzymatické reakce (8-oxo-dGMP) na MTH1. Převzato z (Svensson et al., 2011).

Kromě 8-oxo-dGTP a 8-oxo-GTP katalyzuje MTH1 i hydrolyzu 2-hydroxy-dATP (2-OH-dATP), 2-OH-ATP, 8-oxo-dATP a 8-oxo-ATP. Enzymatická aktivita MTH1 je pro deriváty ATP vyšší, než 8-oxo-dGTP. Hodnoty Michaelisovy konstanty (K_m) byly stanoveny pomocí absorbance v UV spektru na základě kvantifikace dNTP a jejich produktů po hydrolyze při pH 7; $K_m = 8,3 \mu\text{M}$ pro hydrolyzu 2-OH-dATP zatímco pro 8-oxo-dGTP $K_m = 15,2 \mu\text{M}$ (Fujikawa et al., 1999). Měření enzymatické aktivity pomocí PPILight inorganic pyrophosphate assay kitu při pH 7,5 pak udává hodnoty pro hydrolyzu 2-OH-dATP $K_m = 14 \pm 6,0 \mu\text{M}$ a pro 8-oxo-dGTP $K_m = 11 \pm 2,7 \mu\text{M}$ (Nissink et al., 2016).

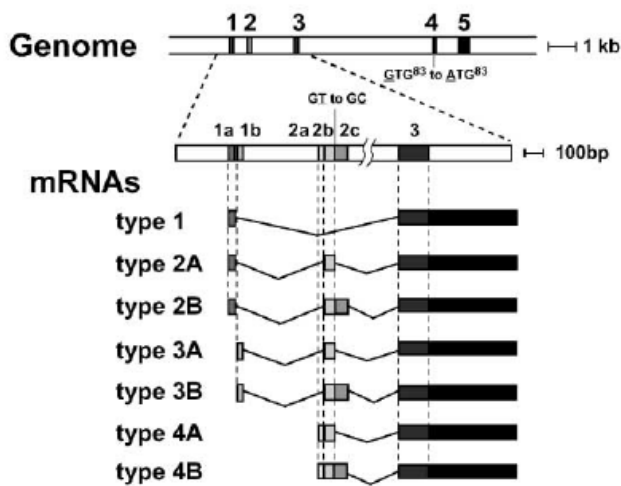
4.1.2 Exprese MTH1

Lidský *MTH1* gen se nachází na chromozomu 7p22 a obsahuje pět hlavních exonů. Alternativním sestřihem vzniká sedm typů MTH1 (Obrázek 5) (Nakabeppu, 2001). Nejčastější formou mRNA izolované z lidských buněk je *MTH1* typu 1, tedy s vystřiženým exonem 2. N-konec je nejspíš zodpovědný za translokaci MTH1 do mitochondrie.

Vyšší exprese je spojena s rychlejší proliferací. Příkladem je experiment provedený na periferních T-lymfocytech nacházejících se většinou v G0 fázi, které se po inkubaci s fytohemaglutininem (PHA) a IL-2 (interleukinem 2) opět začínají dělit a obsah mRNA MTH1 se zvyšuje 7x. Vysoká hladina mRNA *MTH1* byla dále pozorována např. v embryonální tkáni, v brzlíku nebo varlatech (Oda et al., 1997). V rakovinných buňkách nebo

v neuronech substantia nigra pacientů trpících Parkinsonovou chorobou (Shimura-Miura et al., 1999), tedy v buňkách vystavovaných silnému oxidativnímu stresu, je také detekovatelné velké množství MTH1 proteinu v porovnání se zdravou tkání. Buněčná proliferace tedy aktivuje expresi MTH1 proteinu.

MTH1 promotor nese sekvenci pro vazbu transkripčních faktorů z rodiny Ets, které regulují genovou expresi v návaznosti na RAS signalizaci a hrají roli v mitogenní signalizaci. Promotor také obsahuje sekvence vázající transkripční faktory NF-κB a AP-1 (Nakabeppu, 2001), jejichž exprese se zvyšuje při oxidativním stresu. AP-1 je aktivován růstovými faktory a dále aktivuje geny buněčné proliferace a diferenciaci (Chiu et al., 2010).



Obrázek 5

Exon-intronová struktura genu lidského *MTH1* s pěti exony. Alternativním sestřihem mRNA vzniká sedm typů mRNA.

Převzato z (Oda et al., 1999).

4.1.3 Nadměrná exprese MTH1 v rakovinných buňkách

Hladina 8-oxo-dGTP je u rakovinných buněk několikanásobně vyšší, než ve zdravé tkáni (Cooke et al., 2006), což indikuje, že neustále čelí oxidativnímu stresu. Proto je pro ně prevence mutací způsobených inkorporací poškozených nukleotidů naprosto nezbytná. Tuto ochranu jim mimo jiné poskytuje MTH1 protein. V buňkách rakoviny ledvin (RCC) je ve srovnání se zdravou tkání exprimováno markantně vyšší množství *MTH1* mRNA, které dále narůstá v pokročilejších stádiích nemoci (Okamoto et al., 1996). Kennedy *et al.* ve svém experimentu prokázali zvýšenou expresi *MTH1* mRNA v immortalizovaných nenádorových bronchiálních epiteliálních buňkách a v buňkách rakoviny plic (Kennedy et al., 1998). Stejný jev byl pozorován také u rakoviny prsu, tlustého střeva a konečníku, jícnu či v myelomu (Akiyama et al., 2017; Koketsu et al., 2004; Okamoto et al., 1996; Wani et al., 1998). U všech

zmíněných nádorů byla metodou western blot potvrzena také zvýšená exprese proteinu (Huixing Zhou et al. 2017; Akiyama et al. 2017; Koketsu, Watanabe, a Nagawa 2004; Okamoto et al. 1996; Wani, Milo, a D'Ambrosio 1998).

4.1.4 Spontánní tumorigeneze *Mth1*^{-/-} myši

Vzhledem k tomu, že MTH1 hydrolyzuje poškozené dNTP, které prokazatelně způsobují bodové mutace, logicky z toho vyplývá, že *Mth1*-deficitní myši by měly vykazovat více spontánních nádorů než myši, které MTH1 disponují. Tato hypotéza byla ověřena porovnáním *Mth1*^{+/+} a mutantních *Mth1*^{-/-} myši. Po 18 měsících života se ukázalo, že statistická incidence spontánních nádorů jater, plic a žaludku je u *Mth1*^{-/-} myši výrazně vyšší (34 z 93 tj. 36% myši), než u *Mth1*^{+/+} (10 z 90 tj. 11% myši). Doba přežití se ale mezi oběma typy nelišila. Zvýšený výskyt hepatocelulárního karcinomu koreloval s vyšší expresí MTH1 ve wild-type jaterních buňkách. Dalším faktorem, který zřejmě ovlivňuje vznik nádorů, je hormonální prostředí. Výskyt jaterních nádorů byl totiž u *Mth1*^{-/-} samců vyšší, než u *Mth1*^{-/-} samic. Hladina antioxidantů se napříč orgány liší. To také způsobuje, že má *Mth1* deficiencie na každý orgán různě velký vliv (Tsuzuki et al., 2001). Jiný experiment později ukázal, že *Mth1*-deficitní myši nevykazují vyšší výskyt G->T transverze, zatímco u $\Delta mutT$ *E. coli* se tento typ mutace zvyšuje 1000x. Z toho vzešla hypotéza, že savčí buňky buď disponují dalším enzymem schopným degradace 8-oxo-dGTP, nebo jsou tato poškození zcela opravována systémy MSH či BER (Egashira et al., 2002).

4.1.5 Role MTH1 a dalších opravných mechanismů v senescenci

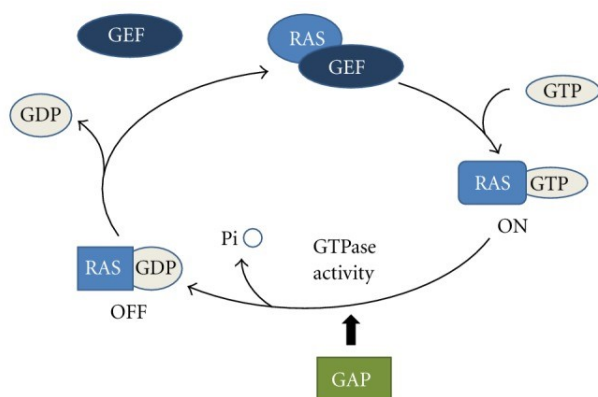
Vysoká koncentrace 8-oxo-dGTP, které jsou následně inkorporovány do DNA, způsobuje akumulaci oxidativního poškození v genomu vedoucí k senescenci. V immortalizovaných lidských fibroblastech, kde byla exprese MTH1 snížena pomocí shRNA, nebylo 8-oxo-dGTP odbouráváno, čímž rostla jeho hladina. Množství ROS i antioxidantů v buňce zůstalo beze změny. Nahromadění 8-oxo-dG v chromozomální DNA snižovalo efektivitu BER. V důsledku nedokončených oprav DNA vznikaly jedno- a dvouvláknové zlomy, následkem čehož se aktivovala p53/p21 dráha, která je asociována s genotoxickým stresem (Rai et al., 2009). Poškození DNA a signalizace aktivovaná dvouvláknovými zlomy jsou typické znaky replikativní senescence (Fagagna et al., 2003).

Ogg1^{-/-} myši vykazují 5x vyšší výskyt rakoviny plic než WT a v jejich genomu se hromadí 8-oxo-dG. Naopak v *Ogg1*^{-/-}*Mth1*^{-/-} myších není vznik nádoru pozorován, i když je do DNA 8-oxo-dG inkorporován v ještě větší míře. *Mth1* knockout tedy zamezil tumorigenezi u *Ogg1*^{-/-} myši, což by podle autorů mohlo být způsobeno akumulací oxidovaných forem adeninu v genomu, jejichž eliminaci MTH1 katalyzuje (Fagagna et al., 2003).

Akumulace 8-oxo-dG v DNA zvyšuje aktivitu enzymu MUTYH, jejímž následkem vznikají v opravovaných oblastech apurynní místa, která jsou poté AP endonukleázou převedeny na zlomy. Jejich nadměrný výskyt v jaderné i mitochondriální DNA aktivuje senescenci a buněčnou smrt (Oka et al., 2008).

4.1.6 Role MTH1 v RAS-indukovaných nádorech

RAS proteiny (KRAS, H-RAS či N-RAS) jsou GTPázy, které hydrolyzují přeměnu GTP na GDP, čímž způsobují aktivaci signálních drah vedoucích k buněčné proliferaci, růstu a diferenciaci. Mutace v *RAS* protoonkogenech, které vedou k jejich permanentní aktivaci, způsobují až 30% nádorových transformací buněk. RAS proteiny se nacházejí ve dvou stavech: zapnutém při navázání GTP, nebo vypnutém po hydrolýze GTP na GDP. Přechod mezi vypnutým a zapnutým stavem zajišťují GEF (guanine nucleotide exchange-factors, např. Sos) a inaktivaci proteinu RAS, tedy hydrolýzu GTP, mají na starosti GAP (GTPase-activating proteins), (Obrázek 6).



Obrázek 6

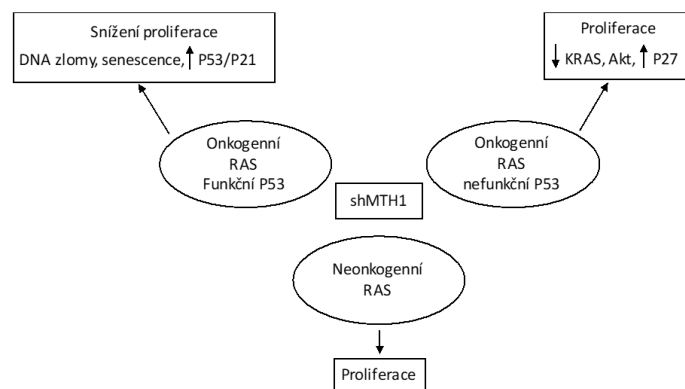
Schéma znázorňuje systém aktivace RAS proteinu při navázání GTP a deaktivace za pomoci GAP hydrolýzou GTP na GDP za uvolnění anorganického fosfátu.

Převzato z (D'Arcangelo and Cappuzzo, 2012).

Aktivita RAS ovlivňuje i produkci ROS. RAS totiž přes Rac-GTP signalizaci aktivuje NADPH oxidázy, které produkují superoxidové radikály (viz kapitola **Chyba! Záložka není definována.**), (Fernandez-Medarde and Santos, 2011). Nadměrná exprese a aktivita RAS tím pádem může vést i k oxidativnímu poškození DNA a mobilizaci DDR. Pokud nedojde ke kompenzaci, může to v konečném důsledku vést k senescenci. Ochranu buněk před senescencí spuštěnou oxidativním poškozením DNA zajišťuje právě MTH1 protein. To dokazuje fakt, že

umělé zvýšení MTH1 exprese ve fibroblastech, které byly předem transfekovány onkogenním H-RAS, zamezilo senescenci. Naopak buňky s nadměrnou expresí RAS, které mají normální expresní hladinu MTH1, se přestávají po 3 týdnech dělit, vykazují vysokou hladinu p53/p21, β -galaktosidázy a dvojité zlomy DNA, což jsou známky senescence (Rai et al., 2011). Zároveň onkogenní KRAS v RAS-indukovaných nádorech zvyšuje expresi MTH1, čímž se adaptuje na oxidativní stres a zajišťuje buňce možnost dalšího dělení.

KRAS mutantní rakovinné buňky exprimující P53^{wt} důsledkem snížení exprese MTH1 proteinu pomocí shRNA zpomalují proliferaci, vznikají u nich DNA zlomy a jeví známky senescence (včetně zvýšení hladiny p53/p21). Pokud tyto buňky exprimují nefunkční P53 (případně se jeho exprese sníží pomocí shRNA či genovou delecí), dochází ke zvýšení exprese P27 (jiného inhibitoru buněčného cyklu) a zároveň ke snížení exprese KRAS a Akt, které jsou součástí drah generujících ROS. Nedochází však ke vzniku DNA zlomů a k senescenci. Obnovení exprese či funkčnosti P53 v těchto buňkách se sníženou expresí MTH1 ale DNA zlomy a senescenci znovu vyvolává. Snížení exprese MTH1 v buňkách exprimujících neonkogenní RAS protein nemá na jejich proliferaci žádný vliv (Obrázek 7) (Patel et al., 2015).



Obrázek 7

Schéma znázorňuje rozdílný vliv snížené exprese MTH1 proteinu v buňkách exprimujících neonkogenní RAS a onkogenní RAS. Dopad nižší exprese MTH1 se u buněk exprimujících onkogenní RAS liší v závislosti na přítomnosti funkčního P53.

5 MTH1 jako potenciální terapeutický cíl

Nádorová onemocnění jsou spojena s vysokou produkcí ROS, následkem čehož se tvoří velké množství oxidací poškozených nukleotidů (viz kapitola 2.4). Rakovinné buňky kladou větší nárok na opravné mechanismy a některé řeší vysokou hladinu 8-oxo-dGTP zvýšením exprese MTH1 (viz kapitola 4.1.3). MTH1 se tak stává nadějným cílem protinádorové léčby.

Např. vyšší exprese RAS proteinu v pokročilejším stádiu rakoviny je spojena s rozsáhlou produkcí MTH1. S aktivací RAS souvisí i vznik ROS a roste tedy i potenciál poškození DNA (viz kapitola 4.1.6). Vyřazení MTH1 z funkce má tedy pro buňky RAS-indukovaného nádoru zjevně ničivější charakter než pro zdravé (Burton and Rai, 2015). Přímá inhibice RAS jakožto cíle nádorové terapie je doposud neúspěšná (O'Bryan, 2019). Protein MTH1, který hraje roli v zamezení RAS-indukované senescence, by se proto mohl stát mimo jiné cílem protinádorové terapie nepřímo namířené proti tomuto typu nádorů.

5.1 První generace inhibitorů MTH1

V roce 2014 byly v prestižním časopise Nature vedle sebe publikovány dvě nezávislé práce, které ukázaly, že inhibice MTH1 by mohla být účinná v potlačení rakovinového bujení (Gad et al., 2014; Huber et al., 2014).

Molekula SCH51344 (Tabulka 1) byla už v roce 1995 identifikována jakožto látka, která účinně zpomaluje růst RAS-transformovaných nádorů a zároveň nemá cytotoxický vliv na zdravé buňky. Její inhibiční působení neprobíhá na úrovni MEK či ERK signalizace, které jsou aktivovány působením RAS proteinu (Kumar et al. 1995). Aby bylo možné pochopit, jakým mechanismem SCH51344 na rakovinné buňky působí, bylo třeba zjistit, s kterými proteiny interaguje. Byla proto syntetizována proba nesoucí SCH51344 pro afinitní purifikaci neznámé molekuly v KRAS pozitivních SW480 buňkách. Hmotnostní spektrometrií byly identifikovány dva proteiny s nejvyšší afinitou. Prvním byl protein ADK, jehož dříve publikovaný inhibitor ale neovlivňuje růst nádorových buněk, a dále mu tedy nebyla věnována pozornost. Jako mnohem relevantnější cíl inhibice SCH51344 se zdál být druhý protein MTH1. Série experimentů sice potvrdila, že pravděpodobným cílem SCH51344 je MTH1, nicméně tato látka se v klinické praxi nepoužívala, a tak autoři hledali další potentní inhibitory MTH1. Na základě stavby substrátu a aktivního místa byla otestována kolekce inhibitorů kináz a jako potenciální inhibitor MTH1 byl identifikován inhibitor proteinu c-MET/ALK crizotinib (Tabulka 1). Crizotinib má dvě chirální formy, které se liší specifitou vůči MTH1 a biologickými efekty. (S)-enantiomer se liší od jeho (R)-enantiomeru vysokou afinitou k MTH1 ($IC_{50} = 72$ nM resp. 1375 nM) a zároveň je jen málo efektivním inhibitorem kináz. Po inkubaci buněk s (S)-crizotinibem se zvyšuje hladina markerů značících poškození DNA (jako např. 53BP1 a autofosforylovaného ATM). Nepodařilo se kvantifikovat množství 8-oxo-dGTP v buňce, ale byl pozorován nárůst jeho inkorporace do DNA. (S)-crizotinib způsobil velké množství DNA zlomů následované buněčnou smrtí. *In vivo* v myším xenograftu SW480 buněk zpomalil (S)-crizotinib rozvoj nádoru a jeho velikost redukoval na 50%. Zvýšení

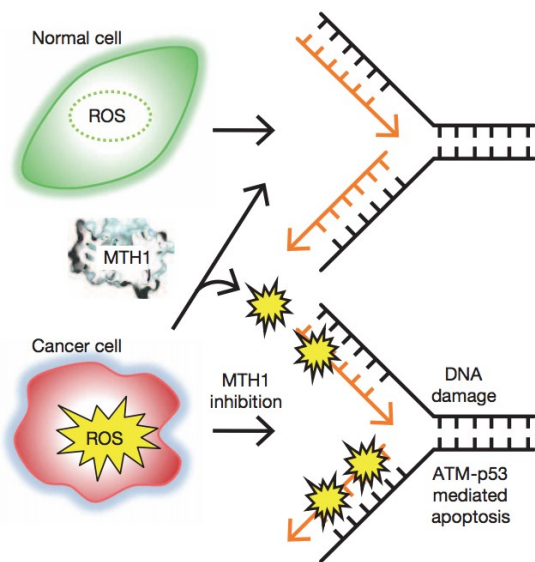
exprese MTH1 v buňkách inkubovaných s (S)-crizotinibem sice snižovalo vznik DNA zlomů, ale nemělo vliv na životaschopnost buněk (IC_{50} se nezvyšovalo), z čehož vzešla otázka, jestli neexistuje nějaký další cíl tohoto inhibitoru, jehož inhibice je důležitější, než inhibice MTH1 (Huber et al., 2014).

Ve druhém článku se Gad *et al.* zabývali MTH1 inhibicí a jejím dopadem na vývoj rakovinných buněk. Jejich prvním krokem bylo zhodnocení, zda je MTH1 skutečně vhodným terapeutickým cílem. Zjistili, že snížení exprese MTH1 pomocí siRNA v primárních lidských buňkách VH10 nemá na jejich životaschopnost negativní vliv. Naopak v rakovinných buňkách U2OS, které jsou vystaveny permanentnímu oxidativnímu stresu, což například ukazuje vysoká karboxylace proteinů, se po snížení exprese MTH1 hromadí protein 53BP1 (Gad et al., 2014). 53BP1 se účastní DDR, při kterém se váže na histon H4 v místech dvojitého zlomu DNA (Gupta et al., 2014). Snížení MTH1 exprese (pomocí siRNA) vedlo k vyšší inkorporaci 8-oxo-dGTP do DNA, zvýšení množství p21, zvýšené fosforylaci p53 a následně k apoptóze. Exprese *MTH1* rezistentního vůči siRNA tyto buňky před smrtí ochránila, exprese katalyticky mrtvého proteinu však ne. Zde se potvrdilo, že pro rakovinné buňky je na rozdíl od zdravých katalytická aktivita MTH1 esenciální a jeho vyřazení má pro ně fatální následky.

Následujícím krokem bylo testování knihovny sloučenin s cílem nalézt účinný nízkomolekulární inhibitor MTH1. Nalezené hity obsahovaly 2-aminopyrimidin (Tabulka 1), jehož modifikací pak vznikly tři nové inhibitory: TH650, TH588 a TH287 (Tabulka 1) s vazbou do aktivního místa MTH1. TH650 má velice nízký inhibiční potenciál ($IC_{50} = 2,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$) a navíc neváže MTH1 v buňkách, a proto není vhodným kandidátem pro protinádorovou terapii. TH287 sice inhibuje MTH1 s nejvyšší účinností ($IC_{50} = 0,8 \pm 0,1 \text{ nM}$), ale na druhou stranu je velice málo metabolicky stabilní. TH588 inhibuje MTH1 o trochu méně ($IC_{50} = 5,0 \pm 0,2 \text{ nM}$), ale zato metabolická stabilita je u něj vysoká. Tyto inhibitory jsou vysoce selektivní pro MTH1 v porovnání s ostatními nudix hydrolázami, včetně MutT. Selektivita byla testována i na dalších 87 enzymech, mezi nimiž byly různé kinázy, GPCR, iontové kanály a transportéry. V té době nebyly žádné potenciální vedlejší cíle odhaleny.

Buněčná odpověď na molekuly TH287 a TH588 je velmi podobná té při depleci MTH1 pomocí siRNA. Pro primární a immortalizované buňky nemá inhibice MTH1 cytotoxický efekt, naopak rakovinné buňky zabíjí (Gad et al., 2014). Nicméně indukce oxidativního stresu za použití silného oxidačního činidla (KBrO_3) vedla k zvýšení cytotoxicity TH588 o cca 20% i v immortalizovaných fibroblastech (Bräutigam et al., 2016). Podobně jako MTH1 deplece i jeho inhibice v buněčných liniích zvyšuje obsah oxidovaných forem nukleotidů v genomové DNA a spouští ATM-p53-zprostředkovanou buněčnou smrt (Obrázek 8). Hladina MUTYH či OGG1

se po inkubaci s inhibitory nemění. Při jejich nadměrné expresi zůstává cytotoxický efekt inhibitorů stejný, ačkoliv jsou zodpovědné za opravu oxidativních poškození DNA. Buňky odpovídají na MTH1 inhibici už v samotném počátku nádorové transformace, kdy se jeho exprese začíná postupně navyšovat. *In vivo* testování na myších s transplantovanými nádory rezistentními na různý typ léčby ukázalo, že tyto rakovinné buňky na aplikaci TH588 odpovídají a růst nádoru se zpomaluje (Gad et al., 2014).



Obrázek 8

Oxidativní poškození DNA způsobené inhibicí MTH1 v rakovinné buňce. Převzato z (Gad et al., 2014).

Další *in vivo* testy účinku TH588 byly provedeny na zebříčkách. Aminokyselinová sekvence zfMTH1 se s hMTH1 sice shoduje jen ze 70%, ale proteinová struktura obou homologů téměř zcela koresponduje. Aminokyselinové rozdíly se nachází mimo oblast vázající TH588, jehož hodnota IC_{50} je pro hMTH1 a zfMTH1 velmi podobná ($1,4 \pm 0,4$ nM resp. $2,8 \pm 0,6$ nM). Mikroinjekce 8-oxo-dGTP do vajíček zebříček životnost ovlivnila jen málo (2-OH-dATP vůbec); když bylo ale zároveň MTH1 inhibováno pomocí TH588, viabilita se markantně snížila.

Na zebříčkách byl také studován vliv VHL-HIF1 α signalizace na citlivost buněk vůči inhibitorům MTH1. Tato signalizační dráha je důležitá v adaptaci buněk na hypoxii a je často deregulována v nádorových onemocněních. VHL kontroluje odbourávání HIF1 α . Ztráta funkce VHL má za následek navyšování hladiny HIF1 α a s tím spojený nárůst hladiny ROS. Stabilizací HIF1 α způsobenou nefunkčním VHL roste i hladina MTH1. Životnost *vhl*^{-/-} embryí zebříček se inhibicí MTH1 výrazně snižuje. Na wild-type embrya zebříček, ve kterých je HIF1 α indukován pomocí DMOG (dimethylxalylglycin) má TH588 podobný cytotoxický efekt. Předchozí inkubace embryí s antioxidanty je před cytotoxicitou TH588 chrání (Bräutigam et al., 2016).

Nadějné výsledky inhibitoru TH588 podnítily snahu o jeho další vylepšení; Warpman Berglund *et al.* syntetizovali molekulu TH1579 (Karonudib; Tabulka 1) s velkým inhibičním potenciálem a s cytotoxickým účinkem na rakovinné buňky (BJ-hTERT-Ras-SV40T) na rozdíl od imortalizovaných (BJ-hTERT). Jeho aktivita navyšuje v buňce hladinu 8-oxo-dGTP; zároveň nadměrná exprese MTH1, MutT proteinu nebo antioxidantů tento jev potlačuje (Warpman Berglund *et al.*, 2016). V myších s osteosarkomem zastavuje jeho růst. Prokazatelně způsobuje vyšší míru inkorporace 8-oxo-dGTP do DNA, čímž posléze vznikají zlomy, dochází k H2AX fosforylaci, štěpení kaspázy 3 a následně apoptóze (Moukengue *et al.*, 2020). Stejně jako TH588 i Karonudib indukuje P53-dependentní DDR. TH1579 je vysoce selektivní, neinhibuje jiné NUDIX hydrolázy ani kinázy nebo BER proteiny (Warpman Berglund *et al.*, 2016). Množství mRNA kódující MTH1, MTH2, MUTYH, NUDT5 nebo OGG1 se po jeho aplikaci nemění (Moukengue *et al.*, 2020). *In vivo* pokusy v myších s xenograftem buněčné linie SW480 ukázaly, že se růst nádoru po léčbě TH1579 signifikantně zpomaluje, hladina markerů pro DNA poškození a apoptózu roste, a naopak markery pro buněčnou proliferaci jsou redukovány (Warpman Berglund *et al.*, 2016). Zároveň v myších modelech snižuje míru migrace rakovinných buněk a jí způsobených metastáz stejně tak, jako angiogenezi (Moukengue *et al.* 2020).

V Karolinska University Hospital probíhají dvě klinické studie Karonudib. V lednu 2017 začala první fáze studie inhibice nádoru (ID: NCT03036228), které se účastní 20 pacientů. Vyhodnocení získaných dat proběhne v říjnu 2020 (Thomas Helleday Foundation, 2019a). První fáze druhé studie karonudibu s pacienty s leukémií byla spuštěna v prosinci 2019 (ID: NCT04077307) (Thomas Helleday Foundation, 2019b).

Podarilo se tedy najít několik molekul, jejichž zacílení účinku na zpomalení nádorového bujení bylo zcela inovativní. Účinně inhibují MTH1 protein, cílí na mechanismus, kterým se rakovinné buňky adaptují na oxidativního stres a chrání je před poškozením DNA. Působí selektivně cytotoxicky na rakovinné buňky, pro které je, na rozdíl od zdravých, MTH1 esenciální.

5.2 Další inhibitory MTH1

S těmito optimistickými výsledky se spustila snaha o nalezení dalších molekul inhibujících MTH1 s ještě lepším inhibičním potenciálem, selektivitou a farmakokinetickými vlastnostmi, které by se daly použít v klinických studiích. Spolu s tím bylo zahájeno nezávislé ověřování mechanismu účinku první generace inhibitorů MTH1, při kterém vyvstala

kontroverze ohledně toho, zda je skutečným cílem MTH1 nebo ne. Kettle *et al.* provedli CRISPRem zprostředkovaný *MTH1* knockout v rakovinných buňkách (SW480). I přes nepřítomnost MTH1 se buňky dále úspěšně dělily (Kettle *et al.*, 2016) a zároveň na ně měl TH588 i (S)-crizotinib stejný cytotoxický efekt, jako na rakovinné buňky disponující MTH1 (Gul *et al.* 2019; Kettle *et al.*, 2016). Znovu tedy provedli genový knockdown pomocí siRNA. Použili původně publikovanou siRNA (Gad *et al.*, 2014) a také komerčně dostupný oligonukleotid. Obě RNAi účinně snižovali expresi MTH1, ale pouze siRNA z (Gad *et al.*, 2014) snižovala viabilitu U2OS buněk. Zároveň aplikace TH588 a (S)-crizotinibu působila cytotoxicky i v buňkách se sníženou expresí MTH1 (Kettle *et al.*, 2016). Warpman Berglund *et al.* ale později ukázali na jiné buněčné linii (NTUB1/P buňky rakoviny močového měchýře) pokles viability se stejným oligonukleotidem. Z toho by vyplývalo, že MTH1 hraje esenciální roli jen u některých typů nádorů. V myších s transplantovaným nádorem buněčné linie SW480 za použití několika odlišných MTH1 RNAi, které snižují MTH1 expresi s různě velkou účinností, koresponduje zpomalení růstu nádoru se stupněm snížení exprese MTH1 (Warpman Berglund *et al.*, 2016), což znovu ukazuje na jeho esenciální roli v rozvoji nádoru.

Bylo syntetizováno několik sérií molekul inhibujících MTH1. Většina z nich však i přes velmi dobré inhibiční vlastnosti *in vitro* nepůsobí na rakovinné buňky cytotoxicky, jako tomu bylo u inhibitorů první generace.

Petrocchi *et al.* na základě vztahu struktury a aktivity (SAR) v krystalu MTH1 vytvořili model, ve kterém optimalizovali molekulu TH287 pro silnější interakci s MTH1. Z 19 syntetizovaných molekul disponují nejlepšími inhibičními vlastnostmi a stabilitou IACS-4619 ($IC_{50} = 0,2 \text{ nM} \pm 0,04$) a IACS-4759 ($IC_{50} = 0,6 \text{ nM} \pm 0,16$) (Tabulka 1). Snadno vstupují do buněk. Liší se pouze v hydroxylové skupině (u IACS-4759), která zřejmě hraje roli v jejich metabolické stabilitě. IACS-4759 je totiž v mikrosomech stabilnější. Na rozdíl od TH588 a TH287 inhibují IACS-4619 a IACS-4759 MTH1 v buňkách U2OS s nadměrnou expresí MTH1 už ve velmi nízkých koncentracích. V publikaci nebyla uvedena žádná data popisující působení nových molekul na viabilitu buněk. Autoři pouze konstatují, že i přes větší inhibiční potenciál a efektivnější inhibici v neporušených buňkách než původní inhibitory, IACS-4619 a IACS-4759 cytotoxický efekt nemají (Petrocchi *et al.*, 2016).

Také Kawamura *et al.* otestováním bezmála 30 tisíc látek z knihovny RIKEN Natural Products Depository našli 20 hitů, ze kterých na základě *in vitro* inhibičních testů vybrali jako slibný inhibitor MTH1 derivát purinu NPD15095 (s IC_{50} v mikromolárních jednotkách). Dvě jeho strukturně podobné molekuly NPD7155 a NPD9948, také obsahující purin. Se svými nanomolárními hodnotami IC_{50} se více blíží inhibitorům první generace (Tabulka 1). Tyto

molekuly se v HeLa buňkách velmi specificky váží na MTH1 protein, neindukují v nich však zvýšení hladiny 8-oxo-dGTP a pouze v hodně vysokých koncentracích způsobují hromadění 53BP1, stejně jako nárůst sub-G1 populace buněk, což je známka umírání buněk. V takto vysoké koncentraci je ovšem inhibice buněčného růstu pozorována i u NPD8880, jiného analogu NPD15095, který vykazuje jen nízkou MTH1 inhibiční aktivitu (Kawamura et al., 2016).

Pro identifikaci další skupiny molekul, jakožto možných inhibitorů MTH1, byla využita metoda fragment-based screenu (FBS). Na rozdíl od high-throughput screeningu (HTS) se pro FBS využívají knihovny s nižším počtem látek menší velikosti a molekulové hmotnosti. Afinity fragmentu k enzymu je obvykle velmi nízká, proto se knihovny pro FBS připravují ve vysoké koncentraci fragmentů. Navázané fragmenty (tzv. „hits“) jsou poté spojeny do jedné molekuly, čímž jejich afinita k danému enzymu roste (Erlanson et al., 2004). Zástupcem molekul identifikovaných ve FBS je BAY-707, jehož IC_{50} se pohybuje v nanomolárních jednotkách (2.3 ± 0.8 nM; Tabulka 1) a při testování kináz nebyla odhalena žádná cross-reaktivita. Je metabolicky stabilní, snadno vstupuje do buněk a umožňuje perorální aplikaci. Jedná se o kompetitivní inhibitor, opět však na rakovinných buňkách HeLa a SW-480 není pozorována, s výjimkou hodně vysokých koncentrací inhibitoru, žádná známka cytotoxicity, ačkoliv biochemický potenciál BAY-707 je pro inhibici MTH1 vyšší, než pro cytotoxický TH588. BAY-707 neindukuje fosforylaci histonu γ H2AX (marker dvojitého zlomu DNA) ani inkorporaci 8-oxo-dGTP, kterou TH588 vyvolává. BAY-707 nepůsobil cytotoxicky ani v *in vivo* nádorových modelech u myši s CT26 adenokarcinomem střev, s NCI-H460 NSCLC (nemalobuněčný karcinom plic) nebo A549 adenokarcinomem (Ellermann et al., 2017).

Ani molekula tetrahydronaphthyridin, metabolicky nestabilní, avšak s dosud nejlepším biochemickým potenciálem ($IC_{50} = 0.043$ nM), a její čtyři analogy (26, 27, 32, 37) (Tabulka 1), nemají cytotoxický vliv na rakovinné buňky (tetrahydronaphthyridin $EC_{50} = 8$ uM, porovnáno s TH287 $EC_{50} = 0,7$ uM). Neaktivují p53, nezpůsobují fosforylaci γ H2AX, ani nezvyšují hladinu 8-oxo-dGTP (Farand et al., 2020).

Na nesrovnalosti ve výsledcích vlivu inhibice MTH1 různými inhibitory na přežití buněk a jejich proliferaci reagovali Warpman Berglund *et al.* Zjistili, že cytotoxicita inhibitorů MTH1 koresponduje se schopností navozovat inkorporaci 8-oxo-dGTP do DNA (Warpman Berglund et al., 2016). AZ (Kettle et al., 2016) ani IACS molekuly (Petrocchi et al., 2016), stejně jako NPD molekuly a BAY-707, na rozdíl od prvních cytotoxických inhibitorů, touto schopností nedisponují a nepůsobí negativně na viabilitu buněk. Autoři připustili možnost, že

by navýšení 8-oxo-dG v DNA první generací inhibitorů mohlo být způsobeno i inhibicí vedlejšího cíle (Warpman Berglund et al., 2016).

Fakt, že nové inhibitory MTH1 i přes podobné či lepší hodnoty IC_{50} jako inhibitory první generace, nenavozují inkorporaci oxidovaných nukleotidů do DNA, vznik dvojitych zlomů a následnou buněčnou smrt vůbec nebo pouze ve velmi vysokých koncentracích, vyvolává otázku, zda TH588, TH279 a (S)-crizotinib nezpůsobují tento efekt jiným mechanismem než na základě inhibice MTH1. Mnoho výsledků vede k závěru, že MTH1 není hlavním cílem těchto cytotoxických molekul. Biochemický potenciál TH287, TH588, SCH51344, a (S)-crizotinib se pohybuje v nanomolárních jednotkách, fenotypový buněčný efekt se ale projevuje až v mikromolárních hodnotách. Nadměrná exprese MTH1 nemění vliv inhibitorů na buňku a cytotoxicita zůstává i přes vyšší hladinu MTH1 stejná (Kawamura et al., 2016). Navíc v rakovinných buňkách s CRISPRem zprostředkovanou delecí *MTH1* má TH588 stejný cytotoxický efekt jako na rakovinné buňky disponující MTH1 (Gul et al., 2019).

Bylo třeba objasnit, zda hraje v rozdílných cytotoxických vlastnostech inhibitorů roli inhibice 8-oxo-dGTPázové aktivity MTH1. Dřívější měření inhibice hydrolytické aktivity MTH1 se provádělo detekcí uvolněného anorganického pyrofosfátu, což je značně nepřesné, jelikož v buňce probíhá mnoho enzymatických reakcí se stejným produktem. Byla vyvinuta ARGO (ATP-releasing guanine-oxidized) sonda, produktem jejíž hydrolyzy, katalyzované MTH1, je 8-oxo-dGMP a ATP. Luciferáza přeměňuje ATP na detekovatelný světelný signál, jehož intenzita odpovídá míře hydrolyzy 8-oxo-dGTP, a je tedy mnohem specifičtější (Ji et al., 2016). Samaranyake *et al.* ji využili pro porovnání inhibice 8-oxo-dGTPázové aktivity inhibitory MTH1 TH588, TH287, které jsou cytotoxické, a IACS, AZ-21 a BAY-707, jež buněčnou smrt nezpůsobují. Rozsah inhibice se mezi těmito molekulami liší jen málo. Dále zjistili, že příspěvek MTH1 k celkové 8-oxo-dGTPázové aktivitě v buňce je napříč typy rakovinných buněk rozdílný. U některých je ARGO esejí i po aplikaci inhibitorů MTH1 nebo MTH1 shRNA stále detekovatelný signál. To znamená, že nejspíš disponují dalším enzymem s podobnou funkcí jako MTH1. Porovnání cytotoxicity inhibitorů první generace v buňkách U2OS, které exprimují MTH1 ve velmi vysoké míře, a PC3 buňkách, jejichž MTH1 hladina je signifikantně nižší, ukázalo, že mají na obě buněčné linie stejný smrtelný efekt. Cytotoxicita inhibitorů první generace tedy zřejmě nesouvisí přímo s inhibicí MTH1, ale nějakého vedlejšího cíle (Samaranyake et al., 2020).

5.3 Dvojitý účinek TH287, TH588 a TH1597

Proteomická analýza (proteomic profiling) inhibice inhibitorů MTH1 odhalila, že TH287 a TH588 mají překvapivě mnoho společného s látkami atakujícími tubulinovou polymeraci (např. paclitaxel, nocodazol), způsobují nárůst populace HeLa buněk v G2/M fázi a indukují Bcl-2 fosforylaci, což jsou typické vlastnosti inhibitorů cílících na tubulin (Kawamura et al., 2016). Warpman *et al.* později tento výsledek ověřovali pomocí CETSA (cellular thermal shift assay) proteomiky (Warpman Berglund et al., 2016). CETSA umožňuje sledovat cílové proteiny inhibitorů přímo v buňkách. Tato metoda je založena na posunu křivky tání proteinu s navázaným inhibitorem v porovnání s křivkou tání samotného proteinu, pomocí čehož lze zjistit, na které proteiny se inhibitor navázal (Molina et al., 2013). Na HCT116 buňkách rakoviny tlustého střeva s mutací v *KRAS* proto-onkogenu sledovali, že se TH588 v mechanismu působení na tubulin, buněčnou smrt a senescenci liší od klasických tubulinových inhibitorů. Indukují nárůst 53BP1, což u anti-mikrotubulárních látek není pozorováno (Warpman Berglund et al., 2016).

Gul *et al.* pozorovali, že TH588 zasahuje mechanismus regulace mitotického vřeténka. TH588 má vliv na mikrotubulární systém, který je nepostradatelný při procesu buněčného dělení. Po inkubaci buněk s TH588 nastává problém při separaci duplikovaných centrozomů a umístění mikrotubulárních aster do opačných pólů buňky. Snižuje mikrotubulární dynamiku a způsobuje opoždující se (lagging) chromozomy. Buňky jsou tak uvězněny v G2/M fázi buněčného cyklu. Při nízké koncentraci inhibitoru je toto zastavení pouze dočasné a buňky po chvíli dělení dokončují. Vysoká koncentrace TH588 způsobuje permanentní blokaci cyklu, nebo je mitóza ukončena bez buněčného dělení. Cytotoxický efekt TH588 u *MTH1*^{-/-} buněk přetrvává, proto zřejmě ani jeho inhibice molekulou TH588 není hlavním původcem zastavení buněčného cyklu v metafázi a snížení mikrotubulární dynamiky. Ovšem možnost, že by MTH1 inhibice *in vivo* přispívala k zastavení růstu nádoru není vyloučena (Gul et al., 2019).

Využití CRISPR screenu pomocí RNA knihovny pro objasňování mechanismů cílení nových léčiv a ztráty buněčných funkcí je účinnější než RNAi, která není schopná navozovat knockout genů, ale pouze knockdown. Její specifita není dokonalá, a proto má krom cíleného genu také efekt na potenciální off-target. CRISPR screen využívá gRNA (guide RNA), která velmi přesně směřuje Cas9 protein k vytváření dvojitých zlomů v cílové oblasti DNA, jejichž opravou jsou do DNA vnášeny mutace. Proteinové produkty těchto mutantních genů ztrácí svou funkčnost. CRISPR screen umožňuje cílený knockout genů a následné pozorování, zda nepřítomnost funkčního proteinu změnila vliv léčiva na buňku, čímž lze identifikovat cíle

nových léčiv (Kurata et al., 2018). Autoři použili dvě knihovny gRNA zasahující přibližně 1000 genů buněčného cyklu a 500 genů kináz. Pozitivní screen odhalil dva geny, jejichž knockout funguje preventivně před cytotoxickým vlivem TH588, jinými slovy bez jejich přítomnosti nejsou buňky na působení TH588 senzitivní. Jsou jimi USP28 (ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 28) a p53 (Gul et al., 2019), oba jsou nedílnou součástí signalizační dráhy zakončené prodloužením prometafáze a zastavením buněčného cyklu v G1 fázi v případě nebezpečí chybného průběhu mitózy (Lambrus et al., 2016). TH588 mitózu prodlužuje. Z toho bylo souzeno, že působení TH588 na regulaci mitotických vláken aktivuje USP28-p53 dráhu. Aplikace TH588 u *USP28*-KO buněk či *TP53*-KO buněk nezpůsobuje v porovnání s wild-type H460 buňkami markantní snížení buněčné populace, z čehož vyplývá, že aktivita USP28 a p53 je pro působení TH588 nezbytná. TH588 také navyšuje hladinu P53BP1 a CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A), které jsou, stejně jako USP28 a p53, součástí mitotic surveillance pathway. (Gul et al., 2019).

Rudd *et al.* nahradili v A2780 buňkách rakoviny vaječníku wild-type Pol δ (polymerázu delta), která s velkou přesností rozlišuje poškozené dNTP od nepoškozených, mutantní formou s vysokou chybovostí („error-prone“, EP). Tím mohli zjistit, jaký podíl na smrti buněk sehrává inkorporace 8-oxo-dGTP do DNA. Samotné nahrazení funkční polymerázy mutantní formou nemělo na poměr zastoupení buněk v S-fázi vliv. Zvýšilo ale senzitivitu buněk na TH588. V buňkách s mutantní formou Pol δ způsobuje TH588 inkorporaci oxidované formy guaninu do DNA, dvojitě zlomy a apoptickou signalizaci ve větším rozsahu než v buňkách s wild-type Pol δ . To potvrzuje, že 8-oxo-dG v DNA skutečně přispívá k buněčné smrti. Bez použití inhibitoru není mezi buňkami s těmito různými Pol δ pozorován rozdíl v četnosti inkorporace 8-oxo-dGTP. 8-oxo-dG v DNA způsobuje replikační stres. Rychlost replikační vidličky působením TH588 klesá u WT i EP Pol δ bez rozdílu. K úplnému přerušení S-fáze však navzdory poškození DNA nedochází. Za fyziologických podmínek je syntéza DNA v S-fázi dokončena. Při replikačním stresu ale mohou být některé oblasti ještě opraveny pomocí Pol δ v mitotické DNA replikaci. Tento jev je u rakovinných buněk velmi častý. Při inhibici MTH1 ale nedochází k odbourávání 8-oxo-dGTP a jsou během mitotické replikace častěji inkorporovány do DNA. Zároveň TH588 způsobuje zastavení buněčného cyklu v mitóze (mitotic arrest), při kterém dochází ke zvýšené produkci ROS, tedy i 8-oxo-dGTP. Autoři ukázali, že buněčná smrt způsobená molekulou TH588 je zvrácena reversinem, inhibitorem mitotické kinázy Mps1. Díky němu nedochází k aktivaci kontrolního bodu sestavení dělicího vřeténka (spindle asseby checkpoint, SAC), který buňce brání v přechodu z metafáze do

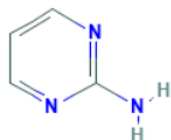
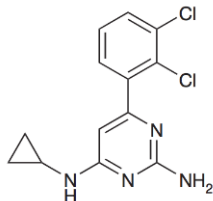
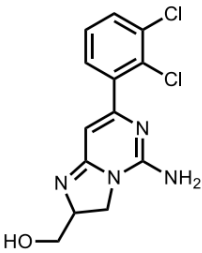
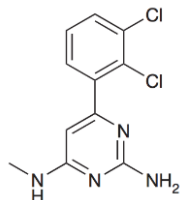
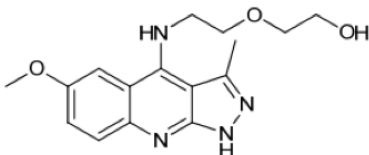
anafáze. Reversin osvobozuje buňku z mitotického arestu. SAC a mitotický arest jsou zjevně nezbytné pro citlivost buněk na TH588 (Rudd et al., 2019).

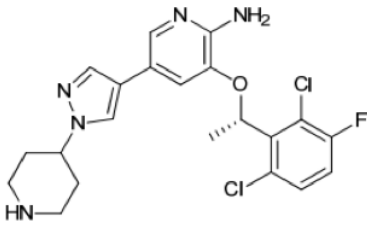
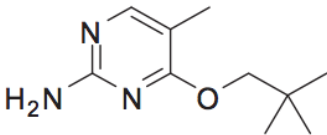
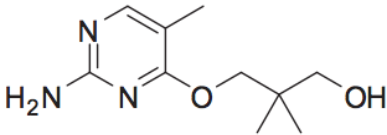
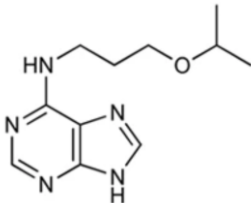
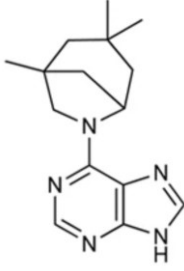
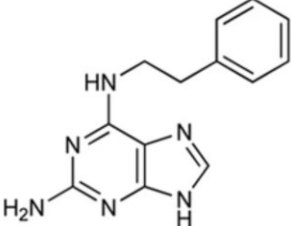
Gad *et al.* dále objasňovali způsob působení inhibitorů MTH1 na mikrotubuly. Deplece MTH1 pomocí RNAi v buňkách U2OS, stejně jako jeho inhibice TH588 a TH1579, způsobuje problémy se správným rozdělením buňky z důvodu špatného napojení kinetochor na mikrotubulinové vlákno a prodloužení mitózy (viz výše). Po snížení exprese MTH1 pomocí siRNA pozorovali zvýšenou mobilitu α -tubulinu, a tedy i nižší míru polymerace. MTH1 interaguje s α -tubulinem a možná má tedy přímo vliv na nukleaci a normální průběh mitózy. TH588 i TH1579 v závislosti na koncentraci snižují mikrotubulární polymeraci a znemožňují interakci mezi α -tubulinem a MTH1, což u inhibitorů bez cytotoxického efektu pozorováno není. TH1579 i TH588 snižují dynamiku mikrotubul.

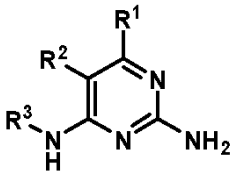
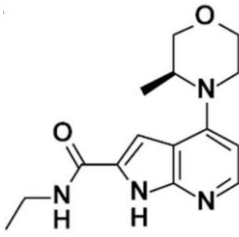
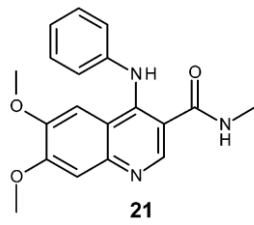
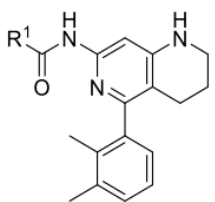
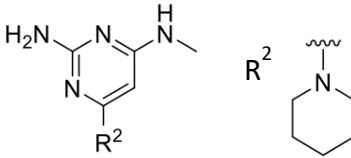
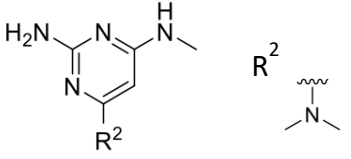
Cytotoxické inhibitory MTH1 tedy fungují dvojitým účinkem. Prodloužení mitózy indukované snížením dynamiky mikrotubul v důsledku inhibice MTH1 vede k nárůstu ROS a vzhledem k neaktivnímu MTH1 i nárůstu 8-oxo-dGTP, což při mitotické replikaci způsobuje větší míru inkorporace do DNA zakončené mitotickou katastrofou. Aby byl inhibitor MTH1 cytotoxický, musí disponovat oběma vlastnostmi. To potvrzuje i fakt, že při vyvolaném zastavení buněčného cyklu v mitóze (mitotic arrest) např. pomocí paclitaxelu a následné inkubaci buněk s inhibitorem MTH1, který sám o sobě nepůsobí cytotoxicky, je pozorována inkorporace oxidovaného guaninu do DNA následovaná buněčnou smrtí (Gad et al., 2019).

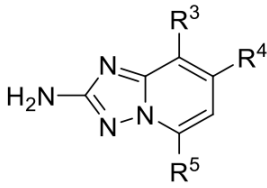
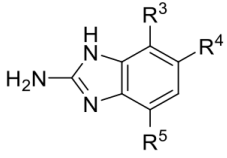
Tabulka 1

Struktury inhibitorů a jejich hodnoty IC50. Cytotoxické inhibitory jsou značeny tučným písmem.

Molekula	Struktura	IC50 (MTH1) ; nM
2-aminopyrimidin	 <p>(Rudd et al., 2019)</p>	
TH588	 <p>(Gad et al., 2014)</p>	<p>5,0 ± 0,2 <i>in vitro</i></p> <p>(Gad et al., 2014)</p>
TH650	 <p>(Gad et al., 2014)</p>	<p>2100 ± 100 <i>in vitro</i></p> <p>(Gad et al., 2014)</p>
TH287	 <p>(Gad et al., 2014)</p>	<p>0,8 ± 0,1 <i>in vitro</i></p> <p>(Gad et al., 2014)</p>
SCH51344	 <p>(Kawamura et al., 2016)</p>	<p>320 ± 40 <i>in vitro</i></p> <p>(Kawamura et al., 2016)</p>

(S)-crizotinib	 <p>(Huber et al. 2014)</p>	<p>72 <i>in vitro</i></p> <p>(Huber et al., 2014)</p>
IACS-4619	 <p>(Petrocchi et al., 2016)</p>	<p>$0,2 \pm 0,04$ <i>in vitro</i></p> <p>(Petrocchi et al., 2016)</p>
IACS-4759	 <p>(Petrocchi et al., 2016)</p>	<p>$0,6 \pm 0,16$ <i>in vitro</i></p> <p>(Petrocchi et al., 2016)</p>
NPD15095	 <p>(Kawamura et al., 2016)</p>	<p>3300 ± 600 <i>in vitro</i></p> <p>(Kawamura et al., 2016)</p>
NPD7155	 <p>(Kawamura et al., 2016)</p>	<p>210 ± 30 <i>in vitro</i></p> <p>(Kawamura et al., 2016)</p>
NPD9948	 <p>(Kawamura et al., 2016)</p>	<p>290 ± 50 <i>in vitro</i></p> <p>(Kawamura et al., 2016)</p>

TH1579	 (Scobie et al., 2014)	310 cytotoxicita v SJSa-1 buňkách (Moukengue et al., 2020)
BAY-707	 (Ellermann et al., 2017)	2.3 ± 0.8 <i>in vitro</i> (Ellermann et al., 2017)
AZ21	 21 (Kettle et al., 2016)	0,5 <i>in vitro</i> (Kettle et al., 2016)
tetrahydronaphthyridin	 (Farand et al., 2020)	
26	 (Farand et al., 2020)	0,80 <i>in vitro</i> (Farand et al., 2020)
27	 (Farand et al., 2020)	51 <i>in vitro</i> (Farand et al., 2020)

32	 <table border="1" data-bbox="566 465 1093 539"> <thead> <tr> <th>R³</th> <th>R⁴</th> <th>R⁵</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>H</td> <td>H</td> <td>2,3-diClPh</td> </tr> </tbody> </table> <p>(Farand et al., 2020)</p>	R ³	R ⁴	R ⁵	H	H	2,3-diClPh	<p>13 <i>in vitro</i></p> <p>(Farand et al., 2020)</p>
R ³	R ⁴	R ⁵						
H	H	2,3-diClPh						
37	 <table border="1" data-bbox="566 797 1093 871"> <thead> <tr> <th>R³</th> <th>R⁴</th> <th>R⁵</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>H</td> <td>H</td> <td>2,3-diClPh</td> </tr> </tbody> </table> <p>(Farand et al., 2020)</p>	R ³	R ⁴	R ⁵	H	H	2,3-diClPh	<p>15 <i>in vitro</i></p> <p>(Farand et al., 2020)</p>
R ³	R ⁴	R ⁵						
H	H	2,3-diClPh						

6 Závěr

Tato práce popisuje roli MTH1 v rakovinných buňkách jakožto adaptační mechanismus na permanentní oxidativní stres, který je společným znakem rakovinných buněk. Oxidací poškozené dNTP jsou snadno inkorporovány do DNA, kde se nesprávně párují, což následně vede ke vzniku mutací. MTH1 katalyzuje hydrolýzu 8-oxo-dGTP, 2-OH-dATP a 8-oxo-dATP za vzniku příslušného dNMP, který již nemůže být do DNA zařazen, čímž MTH1 protein buňku před vznikem mutací chrání. Rakovinné buňky jsou oproti zdravým na aktivitě MTH1 více závislé a jeho exprese je u nich signifikantně vyšší. Z toho vznikla myšlenka využít inhibici MTH1 v protinádorové léčbě. Pomocí RNAi byla dokázána esenciální role MTH1 v některých liniích rakovinných buněk. Bylo syntetizováno několik sérií inhibitorů, z nichž některé fungovaly selektivně cytotoxicky na nádorové buňky ((S)-crizotinib, TH588, TH279, TH1579), jiné však i přes svůj velký inhibiční potenciál nezpomalily nádorové bujení. Bylo zjištěno, že cytotoxicita inhibitorů závisí na jejich schopnosti navozovat inkorporaci 8-oxo-dGTP do DNA. Řada experimentů vedla k přehodnocení původní hypotézy, která pokládala za hlavní cíl cytotoxických inhibitorů MTH1 protein. Ukázalo se, že jeho hlavním cílem působení je mikrotubulární polymerace. Jedná se o zajímavý případ, kdy analýza účinku látky odhalila, že ve skutečnosti ovlivňuje jiný proteinový cíl, než proti kterému byla původně vyvinuta. V současné době probíhá se selektivně cytotoxickým inhibitorem MTH1 pro rakovinné buňky, molekulou Karonudib (TH1579), první fáze klinické studie, která bude vyhodnocena v říjnu 2020.

7 Seznam použité literatury

* sekundární citace

- Akiyama, S., Saeki, H., Nakashima, Y., Iimori, M., Kitao, H., Oki, E., Oda, Y., Nakabeppu, Y., Kakeji, Y., Maehara, Y., 2017. Prognostic impact of MutT homolog-1 expression on esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Med* 6, 258–266.
<https://doi.org/10.1002/cam4.979>
- *Bedard, K., Krause, K.-H., 2007. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews* 87, 245–313.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>
- *Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., Crowe, S.E., 2014. Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. *Physiological Reviews* 94, 329–354. <https://doi.org/10.1152/physrev.00040.2012>
- *Bräutigam, L., Pudelko, L., Jemth, A.-S., Gad, H., Narwal, M., Gustafsson, R., Karsten, S., Carreras Puigvert, J., Homan, E., Berndt, C., Berglund, U.W., Stenmark, P., Helleday, T., 2016. Hypoxic Signaling and the Cellular Redox Tumor Environment Determine Sensitivity to MTH1 Inhibition. *Cancer Res* 76, 2366–2375.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2380>
- Burton, D.G.A., Rai, P., 2015. MTH1 counteracts oncogenic oxidative stress. *Oncoscience* 785. <https://doi.org/10.18632/oncoscience.240>
- Carreras-Puigvert, J., Zitnik, M., Jemth, A.-S., Carter, M., Unterlass, J.E., Hallström, B., Loseva, O., Karem, Z., Calderón-Montaña, J.M., Lindskog, C., Edqvist, P.-H., Matuszewski, D.J., Ait Blal, H., Berntsson, R.P.A., Häggblad, M., Martens, U., Studham, M., Lundgren, B., Wählby, C., Sonnhhammer, E.L.L., Lundberg, E., Stenmark, P., Zupan, B., Helleday, T., 2017. A comprehensive structural, biochemical and biological profiling of the human NUDIX hydrolase family. *Nat Commun* 8, 1541. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01642-w>
- Chiu, W.-C., Chen, C.-J., Lee, T.-S., Chen, Z.-J., Ke, P.-H., Chiang, A.-N., 2010. Oxidative stress enhances AP-1 and NF- κ B-mediated regulation of β 2-Glycoprotein I gene expression in hepatoma cells. *J. Cell. Biochem.* 111, 988–998.
<https://doi.org/10.1002/jcb.22787>
- Cooke, M.S., Rozalski, R., Dove, R., Gackowski, D., Siomek, A., Evans, M.D., Olinski, R., 2006. Evidence for attenuated cellular 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine removal in cancer patients. *Biological Chemistry* 387. <https://doi.org/10.1515/BC.2006.053>
- Coskun, E., Jaruga, P., Jemth, A.-S., Loseva, O., Scanlan, L.D., Tona, A., Lowenthal, M.S., Helleday, T., Dizdaroglu, M., 2015. Addiction to MTH1 protein results in intense expression in human breast cancer tissue as measured by liquid chromatography-isotope-dilution tandem mass spectrometry. *DNA Repair* 33, 101–110.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.05.008>
- Culp, S.J., Cho, B.P., Kadlubar, F.F., Evans, F.E., 1989. Structural and conformational analyses of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Chem. Res. Toxicol.* 2, 416–422.
<https://doi.org/10.1021/tx00012a010>
- Egashira, A., Yamauchi, K., Yoshiyama, K., Kawate, H., Katsuki, M., Sekiguchi, M., Sugimachi, K., Maki, H., Tsuzuki, T., 2002. Mutational specificity of mice defective in the MTH1 and/or the MSH2 genes. *DNA Repair (Amst.)* 1, 881–893.
[https://doi.org/10.1016/s1568-7864\(02\)00113-1](https://doi.org/10.1016/s1568-7864(02)00113-1)
- Einolf, H.J., Guengerich, F.P., 2001. Fidelity of Nucleotide Insertion at 8-Oxo-7,8-dihydroguanine by Mammalian DNA Polymerase δ : STEADY-STATE AND PRE-

- STEADY-STATE KINETIC ANALYSIS. *J. Biol. Chem.* 276, 3764–3771.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M006696200>
- Ellermann, M., Eheim, A., Rahm, F., Viklund, J., Guenther, J., Andersson, M., Ericsson, U., Forsblom, R., Ginman, T., Lindström, J., Silvander, C., Trésaugues, L., Giese, A., Bunse, S., Neuhaus, R., Weiske, J., Quanz, M., Glasauer, A., Nowak-Reppel, K., Bader, B., Irlbacher, H., Meyer, H., Queisser, N., Bauser, M., Haegebarth, A., Gorjánác, M., 2017. Novel Class of Potent and Cellularly Active Inhibitors Devalidates MTH1 as Broad-Spectrum Cancer Target. *ACS Chem. Biol.* 12, 1986–1992. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00370>
- Erlanson, D.A., McDowell, R.S., O'Brien, T., 2004. Fragment-Based Drug Discovery. *J. Med. Chem.* 47, 3463–3482. <https://doi.org/10.1021/jm040031v>
- Fagagna, F. d'Adda di, Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., Jackson, S.P., 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426, 194–198.
<https://doi.org/10.1038/nature02118>
- Farand, J., Kropf, J.E., Blomgren, P., Xu, J., Schmitt, A.C., Newby, Z.E., Wang, T., Murakami, E., Barauskas, O., Sudhamsu, J., Feng, J.Y., Niedziela-Majka, A., Schultz, B.E., Schwartz, K., Viatchenko-Karpinski, S., Korniyev, D., Kashishian, A., Fan, P., Chen, X., Lansdon, E.B., Ports, M.O., Currie, K.S., Watkins, W.J., Notte, G.T., 2020. Discovery of Potent and Selective MTH1 Inhibitors for Oncology: Enabling Rapid Target (In)Validation. *ACS Med. Chem. Lett.* 11, 358–364.
<https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.9b00420>
- *Fernandez-Medarde, A., Santos, E., 2011. Ras in Cancer and Developmental Diseases. *Genes & Cancer* 2, 344–358. <https://doi.org/10.1177/1947601911411084>
- Fouquerel, E., Lormand, J., Bose, A., Lee, H.-T., Kim, G.S., Li, J., Sobol, R.W., Freudenthal, B.D., Myong, S., Opresko, P.L., 2016. Oxidative guanine base damage regulates human telomerase activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 1092–1100.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.3319>
- Fujikawa, K., Kamiya, H., Yakushiji, H., Fujii, Y., Nakabeppu, Y., Kasai, H., 1999. The Oxidized Forms of dATP Are Substrates for the Human MutT Homologue, the hMTH1 Protein. *J. Biol. Chem.* 274, 18201–18205.
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.26.18201>
- Fujishita, T., Okamoto, T., Akamine, T., Takamori, S., Takada, K., Katsura, M., Toyokawa, G., Shoji, F., Shimokawa, M., Oda, Y., Nakabeppu, Y., Maehara, Y., 2017. Association of MTH1 expression with the tumor malignant potential and poor prognosis in patients with resected lung cancer. *Lung Cancer* 109, 52–57.
<https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2017.04.012>
- Furuichi, M., Yoshida, M.C., Oda, H., Tajiri, T., Nakabeppu, Y., Tsuzuki, T., Sekiguchi, M., 1994. Genomic Structure and Chromosome Location of the Human mutT Homologue Gene MTH1 Encoding 8-Oxo-dGTPase for Prevention of A:T to C:G Transversion. *Genomics* 24, 485–490. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1657>
- Gad, H., Koolmeister, T., Jemth, A.-S., Eshtad, S., Jacques, S.A., Ström, C.E., Svensson, L.M., Schultz, N., Lundbäck, T., Einarsdottir, B.O., Saleh, A., Göktürk, C., Baranczewski, P., Svensson, R., Berntsson, R.P.-A., Gustafsson, R., Strömberg, K., Sanjiv, K., Jacques-Cordonnier, M.-C., Desroses, M., Gustavsson, A.-L., Olofsson, R., Johansson, F., Homan, E.J., Loseva, O., Bräutigam, L., Johansson, L., Höglund, A., Hagenkort, A., Pham, T., Altun, M., Gaugaz, F.Z., Vikingsson, S., Evers, B., Henriksson, M., Vallin, K.S.A., Wallner, O.A., Hammarström, L.G.J., Wiita, E., Almlöf, I., Kalderén, C., Axelsson, H., Djureinovic, T., Puigvert, J.C., Häggblad, M., Jeppsson, F., Martens, U., Lundin, C., Lundgren, B., Granelli, I., Jensen, A.J.,

- Artursson, P., Nilsson, J.A., Stenmark, P., Scobie, M., Berglund, U.W., Helleday, T., 2014. MTH1 inhibition eradicates cancer by preventing sanitation of the dNTP pool. *Nature* 508, 215–221. <https://doi.org/10.1038/nature13181>
- Gad, H., Mortusewicz, O., Rudd, S.G., Stolz, A., Amaral, N., Brautigham, L., Pudelko, L., Sanjiv, K., Kaldéren, C., Jemth, A.-S., Almlöf, I., Visnes, T., Schultz, N., Boström, J., Calderon Montano, J.M., Hagenkort, A., Groth, P., Loseva, O., Gokturk, C., Koolmeister, T., Wakchaure, P., Homan, E., Ström, C.E., Scobie, M., Bastians, H., Berglund, U.W., Helleday, T., 2019. MTH1 promotes mitotic progression to avoid oxidative DNA damage in cancer cells (preprint). *Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1101/575290>
- *Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., Krizanova, O., 2015. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biology* 6, 260–271. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.010>
- Gul, N., Karlsson, J., Tängemo, C., Linsefors, S., Tuyizere, S., Perkins, R., Ala, C., Zou, Z., Larsson, E., Bergö, M.O., Lindahl, P., 2019. The MTH1 inhibitor TH588 is a microtubule-modulating agent that eliminates cancer cells by activating the mitotic surveillance pathway. *Sci Rep* 9, 14667. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51205-w>
- Gupta, A., Hunt, C.R., Chakraborty, S., Pandita, R.K., Yordy, J., Ramnarain, D.B., Horikoshi, N., Pandita, T.K., 2014. Role of 53BP1 in the Regulation of DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Radiation Research* 181, 1–8. <https://doi.org/10.1667/RR13572.1>
- Hawn, M.T., Umar, A., Carethers, J.M., Marra, G., Kunkel, T.A., Boland, C.R., Koi, M., 1995. Evidence for a connection between the mismatch repair system and the G2 cell cycle checkpoint. *Cancer Res.* 55, 3721–3725.
- *He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., Ma, X., 2017. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell Physiol Biochem* 44, 532–553. <https://doi.org/10.1159/000485089>
- Huber, K.V.M., Salah, E., Radic, B., Gridling, M., Elkins, J.M., Stukalov, A., Jemth, A.-S., Göktürk, C., Sanjiv, K., Strömberg, K., Pham, T., Berglund, U.W., Colinge, J., Bennett, K.L., Loizou, J.I., Helleday, T., Knapp, S., Superti-Furga, G., 2014. Stereospecific targeting of MTH1 by (S)-crizotinib as an anticancer strategy. *Nature* 508, 222–227. <https://doi.org/10.1038/nature13194>
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D., Yamamoto, M., 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes & Development* 13, 76–86. <https://doi.org/10.1101/gad.13.1.76>
- Ji, D., Beharry, A.A., Ford, J.M., Kool, E.T., 2016. A Chimeric ATP-Linked Nucleotide Enables Luminescence Signaling of Damage Surveillance by MTH1, a Cancer Target. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 9005–9008. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b02895>
- Kamiya, H., Kasai, H., 1995. Formation of 2-Hydroxydeoxyadenosine Triphosphate, an Oxidatively Damaged Nucleotide, and Its Incorporation by DNA Polymerases: STEADY-STATE KINETICS OF THE INCORPORATION. *J. Biol. Chem.* 270, 19446–19450. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.33.19446>
- Kawamura, T., Kawatani, M., Muroi, M., Kondoh, Y., Futamura, Y., Aono, H., Tanaka, M., Honda, K., Osada, H., 2016. Proteomic profiling of small-molecule inhibitors reveals dispensability of MTH1 for cancer cell survival. *Sci Rep* 6, 26521. <https://doi.org/10.1038/srep26521>
- Kennedy, C.H., Cueto, R., Belinsky, S.A., Lechner, J.F., Pryor, W.A., 1998. Overexpression of *hMTH1* mRNA: a molecular marker of oxidative stress in lung cancer cells. *FEBS Letters* 429, 17–20. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00505-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00505-5)

- Kettle, J.G., Alwan, H., Bista, M., Breed, J., Davies, N.L., Eckersley, K., Fillery, S., Foote, K.M., Goodwin, L., Jones, D.R., Käck, H., Lau, A., Nissink, J.W.M., Read, J., Scott, J.S., Taylor, B., Walker, G., Wissler, L., Wylot, M., 2016. Potent and Selective Inhibitors of MTH1 Probe Its Role in Cancer Cell Survival. *J. Med. Chem.* 59, 2346–2361. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01760>
- Kim, M.-C., Cui, F.-J., Kim, Y., 2013. Hydrogen Peroxide Promotes Epithelial to Mesenchymal Transition and Stemness in Human Malignant Mesothelioma Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 14, 3625–3630. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.6.3625>
- Koketsu, S., Watanabe, T., Nagawa, H., 2004. Expression of DNA repair protein: MYH, NTH1, and MTH1 in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 51, 638–642.
- Kumar, C.C., Prorock-Rogers, C., Kelly, J., Dong, Z., Lin, J.J., Armstrong, L., Kung, H.F., Weber, M.J., Afonso, A., 1995. SCH 51344 inhibits ras transformation by a novel mechanism. *Cancer Res.* 55, 5106–5117.
- *Kurata, M., Yamamoto, K., Moriarity, B.S., Kitagawa, M., Largaespada, D.A., 2018. CRISPR/Cas9 library screening for drug target discovery. *J Hum Genet* 63, 179–186. <https://doi.org/10.1038/s10038-017-0376-9>
- Lambrus, B.G., Daggubati, V., Uetake, Y., Scott, P.M., Clutario, K.M., Sluder, G., Holland, A.J., 2016. A USP28–53BP1–p53–p21 signaling axis arrests growth after centrosome loss or prolonged mitosis. *Journal of Cell Biology* 214, 143–153. <https://doi.org/10.1083/jcb.201604054>
- *Li, G.-M., 2008. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* 18, 85–98. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.115>
- *Li, Y.R., Trush, M., 2016. Defining ROS in Biology and Medicine. *ROS* 1. <https://doi.org/10.20455/ros.2016.803>
- *McLennan, A.G., 2006. The Nudix hydrolase superfamily. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 123–143. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5386-7>
- Mishima, M., Sakai, Y., Itoh, N., Kamiya, H., Furuichi, M., Takahashi, M., Yamagata, Y., Iwai, S., Nakabeppu, Y., Shirakawa, M., 2004. Structure of Human MTH1, a Nudix Family Hydrolase That Selectively Degrades Oxidized Purine Nucleoside Triphosphates. *J. Biol. Chem.* 279, 33806–33815. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402393200>
- Molina, D.M., Jafari, R., Ignatushchenko, M., Seki, T., Larsson, E.A., Dan, C., Sreekumar, L., Cao, Y., Nordlund, P., 2013. Monitoring Drug Target Engagement in Cells and Tissues Using the Cellular Thermal Shift Assay. *Science* 341, 84–87. <https://doi.org/10.1126/science.1233606>
- Morgan, M.J., Liu, Z., 2011. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res* 21, 103–115. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.178>
- Moukengue, B., Brown, H.K., Charrier, C., Battaglia, S., Baud'huin, M., Quillard, T., Pham, T.M., Pateras, I.S., Gorgoulis, V.G., Helleday, T., Heymann, D., Berglund, U.W., Ory, B., Lamoureux, F., 2020. TH1579, MTH1 inhibitor, delays tumour growth and inhibits metastases development in osteosarcoma model. *EBioMedicine* 53, 102704. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102704>
- Nakabeppu, Y., 2001. Molecular genetics and structural biology of human MutT homolog, MTH1. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 477, 59–70. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00096-3](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00096-3)
- *Nguyen, T., Nioi, P., Pickett, C.B., 2009. The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* 284, 13291–13295. <https://doi.org/10.1074/jbc.R900010200>

- Nissink, J.W.M., Bista, M., Breed, J., Carter, N., Embrey, K., Read, J., Winter-Holt, J.J., 2016. MTH1 Substrate Recognition—An Example of Specific Promiscuity. *PLoS ONE* 11, e0151154. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151154>
- *O'Bryan, J.P., 2019. Pharmacological targeting of RAS: Recent success with direct inhibitors. *Pharmacological Research* 139, 503–511. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.10.021>
- Oda, H., Nakabeppu, Y., Furuichi, M., Sekiguchi, M., 1997. Regulation of Expression of the Human *MTH1* Gene Encoding 8-Oxo-dGTPase: ALTERNATIVE SPLICING OF TRANSCRIPTION PRODUCTS. *J. Biol. Chem.* 272, 17843–17850. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.28.17843>
- Oka, S., Ohno, M., Tsuchimoto, D., Sakumi, K., Furuichi, M., Nakabeppu, Y., 2008. Two distinct pathways of cell death triggered by oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNAs. *EMBO J* 27, 421–432. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601975>
- Okamoto, K., Toyokuni, S., Kim, W.J., Ogawa, O., Kakehi, Y., Arao, S., Hiai, H., Yoshida, O., 1996. Overexpression of human mutT homologue gene messenger RNA in renal-cell carcinoma: evidence of persistent oxidative stress in cancer. *Int. J. Cancer* 65, 437–441. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19960208\)65:4<437::AID-IJC7>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19960208)65:4<437::AID-IJC7>3.0.CO;2-Y)
- *Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., Zhivotovsky, B., 2007. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12, 913–922. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0756-2>
- Papeo, G., 2016. MutT Homolog 1 (MTH1): The Silencing of a Target. *J. Med. Chem.* 59, 2343–2345. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00283>
- Patel, A., Burton, D.G.A., Halvorsen, K., Balkan, W., Reiner, T., Perez-Stable, C., Cohen, A., Munoz, A., Giribaldi, M.G., Singh, S., Robbins, D.J., Nguyen, D.M., Rai, P., 2015. MutT Homolog 1 (MTH1) maintains multiple KRAS-driven pro-malignant pathways. *Oncogene* 34, 2586–2596. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.195>
- Petrocchi, A., Leo, E., Reyna, N.J., Hamilton, M.M., Shi, X., Parker, C.A., Mseeh, F., Bardenhagen, J.P., Leonard, P., Cross, J.B., Huang, S., Jiang, Y., Cardozo, M., Draetta, G., Marszalek, J.R., Toniatti, C., Jones, P., Lewis, R.T., 2016. Identification of potent and selective MTH1 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 26, 1503–1507. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.02.026>
- Rai, P., Onder, T.T., Young, J.J., McFaline, J.L., Pang, B., Dedon, P.C., Weinberg, R.A., 2009. Continuous elimination of oxidized nucleotides is necessary to prevent rapid onset of cellular senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 169–174. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809834106>
- Rai, P., Young, J.J., Burton, D.G.A., Giribaldi, M.G., Onder, T.T., Weinberg, R.A., 2011. Enhanced elimination of oxidized guanine nucleotides inhibits oncogenic RAS-induced DNA damage and premature senescence. *Oncogene* 30, 1489–1496. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.520>
- Rudd, S.G., Gad, H., Amaral, N., Hagenkort, A., Groth, P., Ström, C.E., Mortusewicz, O., Berglund, U.W., Helleday, T., 2019. MTH1 inhibitor TH588 induces mitosis-dependent accumulation of genomic 8-oxodG and disturbs mitotic progression (preprint). *Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1101/573931>
- Rudd, S.G., Valerie, N.C.K., Helleday, T., 2016. Pathways controlling dNTP pools to maintain genome stability. *DNA Repair* 44, 193–204. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.05.032>
- Russo, M.T., De Luca, G., Degan, P., Bignami, M., 2007. Different DNA repair strategies to combat the threat from 8-oxoguanine. *Mutation Research/Fundamental and Molecular*

- Mechanisms of Mutagenesis 614, 69–76.
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.03.007>
- Sakai, Y., Furuichi, M., Takahashi, M., Mishima, M., Iwai, S., Shirakawa, M., Nakabeppu, Y., 2002. A Molecular Basis for the Selective Recognition of 2-Hydroxy-dATP and 8-Oxo-dGTP by Human MTH1. *J. Biol. Chem.* 277, 8579–8587.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110566200>
- Sakumi, K., Furuichi, M., Tsuzuki, T., Kakuma, T., Kawabata, S., Maki, H., Sekiguchi, M., 1993. Cloning and expression of cDNA for a human enzyme that hydrolyzes 8-oxo-dGTP, a mutagenic substrate for DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* 268, 23524–23530.
- Sakumi, K., Tominaga, Y., Furuichi, M., Xu, P., Tsuzuki, T., Sekiguchi, M., Nakabeppu, Y., 2003. Ogg1 knockout-associated lung tumorigenesis and its suppression by Mth1 gene disruption. *Cancer Res.* 63, 902–905.
- Samaranayake, G.J., Troccoli, C.I., Zhang, L., Huynh, M., Jayaraj, C.J., Ji, D., McPherson, L., Onishi, Y., Nguyen, D.M., Robbins, D.J., Karbaschi, M., Cooke, M.S., Barrientos, A., Kool, E.T., Rai, P., 2020. The Existence of MTH1-independent 8-oxodGTPase Activity in Cancer Cells as a Compensatory Mechanism against On-target Effects of MTH1 Inhibitors. *Mol Cancer Ther* 19, 432–446. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-19-0437>
- Schreck, R., Rieber, P., Baeuerle, P.A., 1991. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 10, 2247–2258.
- Scobie, M., Helleday, T., Koolmeister, T., Jacques, S., Desroses, M., Jacques-Cordonnier, M.-C., 2014. Pyrimidine-2,4-Diamine Derivatives for Treatment of Cancer.
- *Scott, T.L., Rangaswamy, S., Wicker, C.A., Izumi, T., 2014. Repair of Oxidative DNA Damage and Cancer: Recent Progress in DNA Base Excision Repair. *Antioxidants & Redox Signaling* 20, 708–726. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5529>
- Shimura-Miura, H., Hattori, N., Kang, D., Miyako, K., Nakabeppu, Y., Mizuno, Y., 1999. Increased 8-oxo-dGTPase in the mitochondria of substantia nigral neurons in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 46, 920–924.
- Srouji, J.R., Xu, A., Park, A., Kirsch, J.F., Brenner, S.E., 2017. The evolution of function within the Nudix homology clan: Function Evolution in the Nudix Homology Clan. *Proteins* 85, 775–811. <https://doi.org/10.1002/prot.25223>
- *Stone, W.L., Basit, H., Mohiuddin, S.S., 2020. Biochemistry, Antioxidants, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Svensson, L.M., Jemth, A.-S., Desroses, M., Loseva, O., Helleday, T., Högbom, M., Stenmark, P., 2011. Crystal structure of human MTH1 and the 8-oxo-dGMP product complex. *FEBS Letters* 585, 2617–2621. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.07.017>
- Thomas Helleday Foundation, 2019a. MTH1, A Phase I, Study on Tumors Inhibition, First in Human, First in Class (Clinical trial registration No. NCT03036228). clinicaltrials.gov.
- Thomas Helleday Foundation, 2019b. A Phase 1 Study in MDS, AML and ALL Patients to Evaluate Safety, Tolerability and Efficacy of Karonudib (Clinical trial registration No. NCT04077307). clinicaltrials.gov.
- Treffers, H.P., Spinelli, V., Belser, N.O., 1954. A Factor (or Mutator Gene) Influencing Mutation Rates in Escherichia Coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 40, 1064–1071. <https://doi.org/10.1073/pnas.40.11.1064>
- Tsuzuki, T., Egashira, A., Igarashi, H., Iwakuma, T., Nakatsuru, Y., Tominaga, Y., Kawate, H., Nakao, K., Nakamura, K., Ide, F., Kura, S., Nakabeppu, Y., Katsuki, M., Ishikawa, T., Sekiguchi, M., 2001. Spontaneous tumorigenesis in mice defective in the MTH1

- gene encoding 8-oxo-dGTPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 11456–11461. <https://doi.org/10.1073/pnas.191086798>
- *Turrens, J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology* 552, 335–344. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
- *van Loon, B., Markkanen, E., Hübscher, U., 2010. Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. *DNA Repair* 9, 604–616. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.03.004>
- *Wang, Y., 2008. Bulky DNA Lesions Induced by Reactive Oxygen Species. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 276–281. <https://doi.org/10.1021/tx700411g>
- Wani, G., Milo, G.E., D'Ambrosio, S.M., 1998. Enhanced expression of the 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanosine triphosphatase gene in human breast tumor cells. *Cancer Letters* 125, 123–130. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(97\)00507-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(97)00507-7)
- Warpman Berglund, U., Sanjiv, K., Gad, H., Kalderén, C., Koolmeister, T., Pham, T., Gokturk, C., Jafari, R., Maddalo, G., Seashore-Ludlow, B., Chernobrovkin, A., Manoilov, A., Pateras, I.S., Rasti, A., Jemth, A.-S., Almlöf, I., Loseva, O., Visnes, T., Einarsdottir, B.O., Gaugaz, F.Z., Saleh, A., Platzack, B., Wallner, O.A., Vallin, K.S.A., Henriksson, M., Wakchaure, P., Borhade, S., Herr, P., Kallberg, Y., Baranczewski, P., Homan, E.J., Wiita, E., Nagpal, V., Meijer, T., Schipper, N., Rudd, S.G., Bräutigam, L., Lindqvist, A., Filppula, A., Lee, T.-C., Artursson, P., Nilsson, J.A., Gorgoulis, V.G., Lehtiö, J., Zubarev, R.A., Scobie, M., Helleday, T., 2016. Validation and development of MTH1 inhibitors for treatment of cancer. *Annals of Oncology* 27, 2275–2283. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw429>
- *Weinberg, F., Ramnath, N., Nagrath, D., 2019. Reactive Oxygen Species in the Tumor Microenvironment: An Overview. *Cancers* 11, 1191. <https://doi.org/10.3390/cancers11081191>
- *Wu, W.-S., 2007. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 25, 695–705. <https://doi.org/10.1007/s10555-006-9037-8>
- Yanofsky, C., Cox, E.C., Horn, V., 1966. The unusual mutagenic specificity of an E. Coli mutator gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 55, 274–281. <https://doi.org/10.1073/pnas.55.2.274>
- Yu, T.-W., Anderson, D., 1997. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: A chemical investigation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 379, 201–210. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00141-3](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00141-3)
- *Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., Dong, W., 2016. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2016/4350965>
- Zhou, H., Chen, W., 2015. Expression of MTH1 in Multiple Myeloma and Its Relationship with Therapeutic Response. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* 15, e119. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2015.07.304>