

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Michaela Myšáková**

Vybrané aspekty redoxního metabolismu v leukemogenezi

Selected aspects of redox metabolism in leukemogenesis

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: RNDr. Kristýna Pimková, Ph.D.

Praha, 2022

**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, 4.5.2022

.....

Michaela Myšáková

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala především své školitelce RNDr. Kristýně Pimkové, Ph.D. za odborné vedení práce, velkou míru trpělivosti a ochoty a za cenné rady a připomínky, které mi při zpracování práce poskytla.

## Abstrakt

Nádorová krevní onemocnění vznikají akumulací mutací v krvetvorných kmenových buňkách. Vznikne tak maligní klon, který má selekční výhodu díky lepšímu přežívání a neomezené proliferaci, tento proces vývoje leukémie nazýváme leukemogeneze. Leukemogeneze je komplexní proces a je obtížné určit jedinou mutaci, která je za transformaci krvetvorných buněk zodpovědná. Kromě transkripční deregulace způsobené onkogenními fúzními proteiny, hrají v leukemogenezi zásadní roli také mutace specifických genů, které regulují kritické signální dráhy. Mezi takové geny patří například mutace v genech pro isocitrát dehydrogenázu 1 a 2 (*mutIDH1/2*). Předpokládá se, že tyto geny hrají významnou roli ve vývoji leukémie, na což ukazuje jejich vzrůstající frekvence v progresi myelodysplastického syndromu do akutní myeloidní leukémie. Mezi funkce *mutIDH1/2* patří epigenetická regulace, změny v metabolismu a redoxní homeostáze. Bylo zjištěno, že regulace produkce a eliminace reaktivních kyslíkatých látek (ROS), tzv. redoxní homeostáza je důležitá pro správnou funkci hematopoetických kmenových buněk a její narušení je častým jevem doprovázejícím maligní transformaci těchto buněk. Některé mutace, včetně *mutIDH1/2*, ovlivňují produkci a eliminaci ROS, a tím narušují redoxní homeostázu. Výsledkem je pak ovlivnění redoxních kaskád skrze modifikace proteinů, které přispívají k leukemogenezi. Mezi důsledky těchto změn patří neomezená proliferace a narušená diferenciací hematopoetických kmenových buněk. Cílem této práce je přiblížit aspekt redoxního metabolismu *mutIDH1/2* v leukemogenezi.

**Klíčová slova:** leukemogeneze, IDH1/2 mutace, redoxní signalizace, oxidační stres, hematopoeza

## Abstract

Blood cancers are caused by the accumulation of mutations in haematopoietic stem cells. This creates a malignant clone that has a selection advantage due to improved survival and unrestricted proliferation, a process of leukaemia development called leukemogenesis. Leukemogenesis is a complex process and it is difficult to identify a single mutation that is responsible for the transformation of haematopoietic cells. In addition to transcriptional deregulation caused by oncogenic fusion proteins, mutations in specific genes that regulate critical signaling pathways play a critical role in leukemogenesis. Examples of such genes include mutations in the isocitrate dehydrogenase 1 and 2 genes (*mutIDH1/2*). These genes are thought to play an important role in the development of leukaemia, as indicated by their increasing frequency in the progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukaemia. The functions of *mutIDH1/2* include epigenetic regulation, changes in metabolism and redox homeostasis. It has been shown that regulation of reactive oxygen species (ROS) production and elimination, so-called redox homeostasis, is important for the proper function of haematopoietic stem cells and its disruption is a frequent phenomenon accompanying malignant transformation of these cells. Some mutations, including *mutIDH1/2*, affect the production and elimination of ROS and thus disrupt redox homeostasis. As a result, redox cascades are affected through protein modifications that contribute to leukemogenesis. The consequences of these changes include unrestricted proliferation and impaired differentiation of haematopoietic stem cells. The aim of this study is to describe the redox metabolism aspect of *mutIDH1/2* in leukemogenesis.

**Key words:** leukemogenesis, IDH1/2 mutations, redox signaling, oxidative stress, haematopoiesis

## Seznam použitých zkratk

$\alpha$ -KG	$\alpha$ -ketoglutarát
Akt	protein kinase B
AML	akutní myeloidní leukémie
AMPK	adenosine monophosphate-activated protein kinase
AP-1	activator protein 1
ASXL1	additional sex combs-like 1
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATP	adenosin-5'-trifosfát
BCOR	B-cell lymphoma 6 co-repressor
BCORL1	B-cell lymphoma 6 co-repressor-like 1
biCEBPA	bialelická mutace v genu pro CCAAT/enhancer binding protein $\alpha$
BRCC3	BRCA1/BRCA2-containing complex subunit 3
CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein $\alpha$
CN-AML	cytogeneticky normální akutní myeloidní leukémie
CREB	cyclin adenosine monophosphate response element-binding protein
CTCF	CCCTC-binding factor
CUX1	cut-like homeobox 1
(D)-2HG	(D)2-hydroxyglutarát
DNA	deoxyribonucleic acid
DNMT3A	DNA methyltransferase 3A
EFS	přežití bez příhody
ETV6	ETS variant transcription factor 6
EZH2	enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit
FADH <sub>2</sub>	flavinadenin dinukleotid
FANCL	Fanconi anaemia complementation group L
FLT3	Fms-like tyrosine kinase 3
FLT3-ITD	Fms-like tyrosine kinase 3 internal tandem duplication
FLT3-TKD	Fms-like tyrosine kinase 3 mutation in the tyrosine kinase domain
FoxO	Forkhead box protein O
GNB1	G protein subunit $\beta$ 1
GPx	glutathion peroxidase

HIF-1	hypoxia inducible factor 1
HSC	hematopoetické kmenové buňky
HSF1	heat shock factor 1
IDH1	isocitrát dehydrogenáza 1
IDH2	isocitrát dehydrogenáza 2
IDH3	isocitrát dehydrogenáza 3
IR-AML	akutní myeloidní leukémie se středním rizikem
JAK2	Janus kinase 2
JmjC	Jumonji C
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KDM4A	lysine-specific demethylase 4A
KEAP1	Kelch-like ECH asociated protein 1
KIT	KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase
K-RAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LUC7L2	LUC7 like 2, pre-mRNA splicing factor
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDM2	MDM2 proto-oncogene
MDS	myelodysplastický syndrom
MLL4	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 4
MPN	myeloproliferativní onemocnění
mtDNA	mitochondriální DNA
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
mut	mutovaný
myr-AKT	myristoylovaný AKT
NAC	N-acetylcystein
NAD <sup>+</sup>	nikotinamidadenindinukleotid
NADH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotid
NADP <sup>+</sup>	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADPH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NF1	nuclear factor 1
NF-κB	nuclear factor kappa B
NOX	nikotinamidadenindinukleotidfosfát oxidáza
NPM1	nucleophosmin 1

N-RAS	erythroblastoma RAS viral oncogene homolog
NRF2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2
OS	celkové přežití
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase
PIGA	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class A
PIN1	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1
PHD	prolylhydroxylase domain
PPM1D	protein phosphatase, Mg <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> -dependent 1D
PRDX2	peroxiredoxin 2
PRPF8	pre-mRNA processing factor 8
PRPN11	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
PRx	peroxiredoxin
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Ral	RAS like
RNS	reaktivní dusíkaté látky
ROS	reaktivní kyslíkaté látky
RUNX1	runt-related transcription factor 1
s-AML	sekundární akutní myeloidní leukémie
SCREB-1	sterol regulatory element-binding protein 1
SF1	splicing factor 1
SF3B1	splicing factor 3b subunit 1
SMC1A	structural maintenance of chromosomes 1A
SOD	superoxid dismutase
SP1	specificity protein 1
SRSF2	serine and arginine rich splicing factor 2
STAG2	stromal antigen 2
STAT	signal transducer and activator of transcription
t-AML	akutní myeloidní leukémie související s léčbou
TET2	tet methylcytosin dioxygenase 2
TP53	cellular tumor antigen p53
TSC2	tuberous sclerosis complex 2
U2AF1	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1
Wnt	wingless and int-1



wt	wild-type
WT1	Wilms tumour 1
ZRSR2	zinc finger CCCH-type, RNA binding motif and serine/arginine rich 2

# Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>TYPY NÁDOROVÝCH KREVNÍCH ONEMOCNĚNÍ</b> .....	<b>2</b>
2.1	AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKÉMIE .....	2
2.2	MYELOYDYSPLASTICKÝ SYNDROM A SEKUNDÁRNÍ AML .....	2
<b>3</b>	<b>ROLE MUTACÍ V LEUKEMOGENEZI</b> .....	<b>3</b>
3.1	NEJČASTĚJŠÍ MUTACE V AML.....	5
<b>4</b>	<b>ISOCITRÁT DEHYDROGENÁZA 1 A 2</b> .....	<b>6</b>
4.1	NORMÁLNÍ FUNKCE ISOCITRÁTDEHYDROGENÁZ.....	6
4.2	MUTACE V GENECH <i>IDH1</i> A <i>IDH2</i> .....	7
4.3	FUNKCE MUTOVANÝCH <i>IDH1/2</i> .....	8
4.4	ROLE (D)-2HYDROXYGLUTARÁTU V LEUKEMOGENEZI .....	9
4.5	VLIV <i>IDH1/2</i> MUTACÍ NA PROGNÓZU PACIENTŮ .....	10
4.6	VÝVOJ LÉČIV CÍLENÝCH NA MUTOVANÉ <i>IDH1/2</i> .....	11
<b>5</b>	<b>REDOXNÍ METABOLISMUS</b> .....	<b>11</b>
5.1	REAKTIVNÍ KYSLÍKATÉ A DUSÍKATÉ LÁTKY .....	11
5.2	ANTIOXIDAČNÍ SYSTÉM BUNĚK.....	12
5.3	VLIV <i>IDH</i> MUTACÍ NA REDOXNÍ HOMEOSTÁZU .....	14
5.4	VLIV REDOXNÍHO PROSTŘEDÍ NA PROTEOM .....	14
<b>6</b>	<b>ROLE REDOXNÍ HOMEOSTÁZY V HEMATOPOEZE</b> .....	<b>17</b>
6.1	ROLE MIKROPROSTŘEDÍ KOSTNÍ DŘENĚ NA HLADINU ROS V HSC.....	17
6.2	INTRACELULÁRNÍ ZDROJE ROS V HSC .....	17
6.3	KONTROLA HLADINY ROS V HEMATOPOETICKÝCH BUŇKÁCH.....	18
6.3.1	<i>ROS regulované dráhy s rolí v hematopoeze</i> .....	20
<b>7</b>	<b>ROLE REDOXNÍ HOMEOSTÁZY V LEUKEMOGENEZI</b> .....	<b>21</b>
7.1	EXTRACELULÁRNÍ ZDROJE ROS A JEJICH ROLE V LEUKEMOGENEZI.....	21
7.2	INTRACELULÁRNÍ ZDROJE ROS V LEUKEMICKÝCH BUŇKÁCH.....	21
7.3	MUTACE V GENECH VEDOUcí K AKUMULACI ROS V MYELOIDNÍCH LEUKEMICKÝCH BUŇKÁCH....	22
7.4	ZMĚNA AKTIVITY ANTIOXIDAČNÍCH SYSTÉMŮ V LEUKEMOGENEZI .....	24
7.5	ADAPTACE BUNĚK V LEUKEMOGENEZI.....	24
<b>8</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>26</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>27</b>

# 1 Úvod

Oxidačně/redukční (redoxní) metabolismus je nedílnou součástí fyziologických procesů v buňkách. Pro jejich správné fungování je důležité udržování redoxní homeostázy, která je dána rovnováhou mezi produkcí a eliminací reaktivních kyslíkatých a dusíkatých látek (ROS/RNS). Je-li tato rovnováha narušená, nastává oxidační stres, který je pro buňku nebezpečný, jelikož může způsobovat závažná poškození různých intracelulárních struktur a vést ke stárnutí nebo tumorogenezi buněk. Za fyziologických koncentrací jsou však ROS, především pak peroxid vodíku, významnými signálními molekulami. ROS posttranslačně modifikují proteiny na thiolových zbytcích, a tím mohou změnit funkci proteinu, např. změnou struktury, aktivací, inaktivací či ovlivněním jiných signálních posttranslačních modifikací. Bylo zjištěno, že tento reversibilní proces reguluje důležité biologické funkce, např. apoptózu, buněčný cyklus, proteinovou homeostázu a další. Proto je nutné redoxní rovnováhu přísně regulovat.

Mnoho studií uvádí, že redoxní signalizace hraje také významnou roli v normální a maligní hematopoeze. Kontrola nízké hladiny ROS je klíčová pro správnou funkci hematopoetických kmenových buněk (HSC). Její zvýšení vyvolá aktivaci drah vedoucích k proliferaci a diferenciaci HSC. Dojde-li však k akumulaci ROS v HSC, a to z extracelulárních nebo intracelulárních zdrojů, dochází k narušení správné funkce těchto buněk a může dojít k jejich maligní transformaci. Pro leukemické buňky je typická zvýšená hladina ROS. Nádorová krevní onemocnění jsou charakterizovaná ztrátou schopnosti HSC diferencovat se ve zralé krvinky. Předpokládá se, že k maligní transformaci dochází v průběhu života, kdy HSC postupně získávají řadu somatických mutací, které mohou vést k zablokování diferenciačního potenciálu a neomezenému růstu. Vzhledem k tomu, že leukemogeneze je vícestupňový proces, je obzvláště velmi obtížné určit jedinou hnací sílu tohoto procesu. Nicméně bylo prokázáno, že několik leukemogenních genových změn je schopno přeprogramovat metabolické dráhy, indukovat produkci ROS, a tím narušit celkové redoxní prostředí. Patří mezi ně i jedny z častých mutací genů kódujících metabolické enzymy isocitrát dehydrogenázu 1 a 2 (IDH1, IDH2).

Cílem této práce je popsat princip redoxní homeostázy, její funkci v krvetvorných buňkách za fyziologických podmínek a při maligní transformaci. Charakterizujeme vliv leukemogenních mutací na redoxní metabolické dráhy. Na závěr se zaměříme na mutace v genech pro isocitrát dehydrogenázu 1 a 2, jejich onkogenní potenciál, vliv na buněčný metabolismus, redoxní homeostázu a jejich význam v progresi onemocnění.

## 2 Typy nádorových krevních onemocnění

Nádorová krevní onemocnění jsou rozmanitou skupinou komplexních chorob. Vznikají maligní transformací HSC a progenitorových buněk nejčastěji v lymfatických uzlinách a v kostní dřeni. Podle fenotypu buněk se dělí na lymfoidní a myeloidní neoplazmy, které se pak dále dělí na leukémie (akutní a chronické), myelomy a lymfomy (Snowden et al., 2017). Tato práce je zaměřena zejména na myeloidní malignity, a to akutní myeloidní leukémie (AML) a myelodysplastický syndrom (MDS).

### 2.1 Akutní myeloidní leukémie

AML je skupina onemocnění, charakterizovaná akumulací nezralých myeloidních buněk, které ztratily schopnost diferenciaci a odpovědi na regulační mechanismy proliferace (Estey & Döhner, 2006; Hope et al., 2003). Příčinou této nádorové transformace hematopoetických prekurzorů je získání chromosomálních přestaveb a specifických mutací v genech (Rubnitz et al., 2010). SEER statistiky dat sesbíraných mezi lety 2015-2019 na populaci Spojených států amerických uvádějí incidenci AML 4,1 případů na 100 000 obyvatel ročně a úmrtnost 2,7 případů na 100 000 obyvatel ročně. AML se běžněji vyskytuje u starších pacientů, střední hodnota věku první diagnózy AML je cca 68 let. Existují však i případy výskytu u dětí. Častěji jsou navíc tímto onemocněním postiženi muži než ženy (National Cancer Institute, 2022). AML se klinicky manifestuje slabostí, horečkou, nadměrnou únavou, krvácením a snadnější tvorbou modřin. Nejčastějším způsobem léčby je chemoterapie, která může být následovaná transplantací kmenových buněk. Dalšími typy léčby jsou radiační terapie nebo cílená terapie, jako je např. podání monoklonálních protilátek. Navíc je běžná podpůrná péče v průběhu léčby (PDQ® Adult Treatment Editorial Board, 2022). Lindsley et al. (2015) uvádí klasifikaci AML do tří kategorií na základě klinické ontogeneze: de novo AML, AML související s léčbou (t-AML) a sekundární AML (s-AML), vycházející z MDS nebo myeloproliferativního onemocnění (MPN).

### 2.2 Myelodysplastický syndrom a sekundární AML

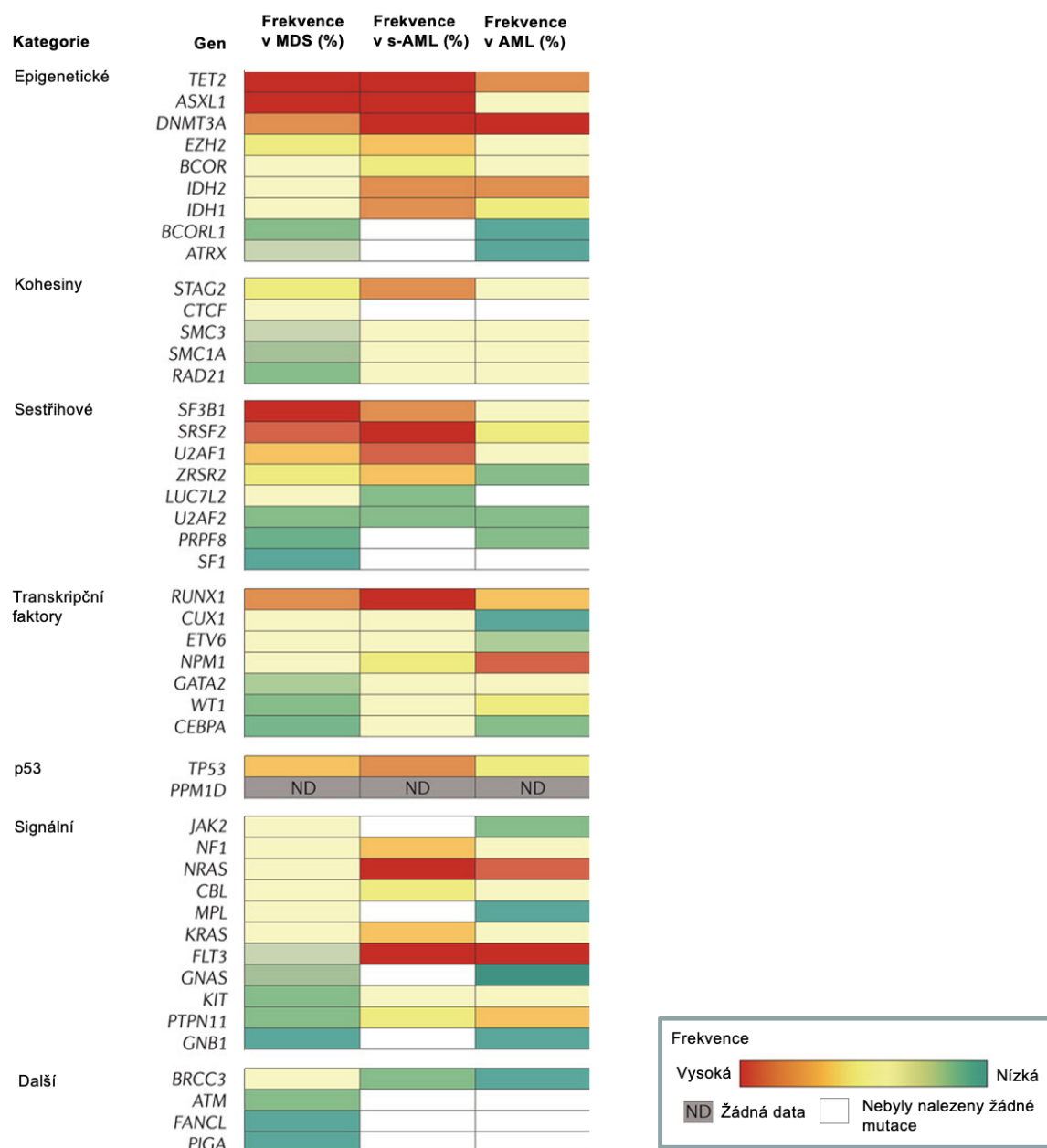
MDS tvoří skupinu klonálních onemocnění, charakterizovaných neúčinnou krvetvorbou v kostní dřeni, vedoucí k morfologicky abnormálnímu vývoji hematopoetických buněk a ke krevním cytopeniím. Ma et al. zpracovali data ze SEER databáze z let 2001 až 2003 sesbíraná z populace Spojených států amerických. MDS se nejčastěji vyskytuje u starších pacientů se střední hodnotou věku při diagnóze 76 let. Roční incidence se výrazně liší u mužů a žen, konkrétně 4,5 na

100 000 obyvatel u mužů a 2,7 na 100 000 obyvatel u žen (Ma et al., 2007). Klinické projevy MDS vycházejí z nedostatku buněk v periferní krvi a patří k nim dušnost, slabost, únava a snadnější krvácení a tvorba modřin. Léčba tohoto onemocnění zahrnuje podpůrnou péči, chorobu modifikující látky, jako je např. imunosupresivní terapie, nebo alogenní transplantaci HSC (PDQ® Adult Treatment Editorial Board, 2021). MDS často přechází v s-AML (Adès et al., 2014). Studie z roku 2012, ve které Walter et al. osekvenovali genom pacientů s MDS před a po transformaci do AML, uvádí, že progresse do s-AML je poháněna získem nových mutací a klonální selekcí. AML je odlišitelná od MDS přítomností 20 a více % blastů v kostní dřeni nebo periferní krvi (Vardiman et al., 2002). S-AML je charakterizovaná horší prognózou oproti de novo AML (Renaud et al., 2016). Liší se i výskytem mutací v konkrétních genech. Lindsley et al. ve studii z roku 2015 přišli na to, že mutace v genech *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *ASXL1*, *EZH2*, *BCOR* a *STAG2* jsou vysoce specifické pro s-AML. Tyto geny jsou zároveň běžně mutované u MDS, což naznačuje, že hrají roli již v progresi MDS (Lindsley et al., 2015).

### 3 Role mutací v leukemogenezi

Transformace buněk v leukemogenezi spočívá v narušení schopnosti diferencovat se a v nabytí schopnosti neomezeně se množit. Tyto procesy jsou podmíněny získem několika genetických mutací v HSC, které dají vznik malignímu klonu (Corces-Zimmerman & Majeti, 2014). Gilliland & Griffin v roce 2002 popsali „2-hit“ model leukemogeneze, který spočívá v tom, že pro maligní transformaci buněk je nutná kooperace dvou tříd mutací v genech. Mutace první třídy je nezbytná pro neomezenou proliferaci buněk a mutace druhé třídy zasahuje do schopnosti diferenciaci a apoptózy buněk (Gilliland & Griffin, 2002). Do mutací třídy I patří běžně se vyskytující mutace v genech *Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3)*, *KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase (KIT)*, *erythroblastoma RAS viral oncogene homolog (N-RAS)* a *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (K-RAS)*, *cellular tumor antigen p53 (TP53)* a další. Mutace třídy II zahrnují např. mutace v genech *nucleophosmin 1 (NPM1)*, *CCAAT/enhancer binding protein α (CEBPA)*, *runt-related transcription factor 1 (RUNX1)* a *GATA binding protein 2 (GATA-2)* (Kihara et al., 2014). S postupnými objevy nových mutovaných genů běžně se vyskytujících v AML se ale ukázalo, že „2-hit“ model leukemogeneze není dostačující. Byly odhaleny další třídy mutací, které přispívají k maligní transformaci buněk. Především jde o mutace v genech důležitých v regulaci epigenetických procesů, methylace DNA a posttranslační histonové modifikace. Do těchto skupin genů jsou zahrnovány např. geny *tet methylcytosin dioxygenase 2 (TET2)*, *isocitrate dehydrogenase 1 a 2 (IDH1/2)*, *additional sex combs-like 1 (ASXL1)* a *DNA methyltransferase 3A (DNMT3A)* (Shih et al., 2012).

Obecně lze v tumorigenezi rozlišit mutace podle jejich potenciálu pohánět vývoj rakovinného onemocnění na driver a passenger mutace. Driver mutace udělují buňkám novou výhodnou schopnost růstu, což vede k selekci těchto mutací v rakovinných buňkách. Passenger mutace nezpůsobují získání žádných schopností užitečných v tumorigenezi, pouze doprovázejí driver mutace (Stratton et al., 2009). Mutace v genech vyskytující se v AML s určitou frekvencí uvádí přehledová Tabulka 1.



**Tabulka 1:** Tabulka frekvence výskytu mutovaných genů u myelodysplastického syndromu (MDS), sekundární akutní myeloidní leukémie (s-AML) a akutní myeloidní leukémie (AML). Převzato z (Sperling et al., 2016) (pozměněno).

### 3.1 Nejčastější mutace v AML a MDS

Mezi nejčastěji se vyskytující genetické modifikace u pacientů s AML patří mutace v genech *FLT3* a *DNMT3A* (Kihara et al., 2014). Ukázalo se, že mají signifikantní vliv na prognózu onemocnění, patří mezi driver mutace v leukemogenezi. *FLT3* kóduje tyrosinkinázový receptor třídy III, důležitý v proliferaci a diferenciaci hematopoetických buněk. Mutace v tomto genu se vyskytuje přibližně u 25 % případů AML (Kihara et al., 2014; Schnittger et al., 2002), a to nejčastěji jako vnitřní tandemová duplikace v juxtamembránové doméně (*FLT3-ITD*), nebo jako bodová mutace v tyrosinkinázové doméně (*FLT3-TKD*). Vede k autofosforylaci a ke konstitutivní aktivaci receptoru, který aktivuje RAS/mitogen-activated protein kinase (MAPK), Signal transducer and activator of transcription (STAT) a phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) /protein kinase B (Akt) signální dráhy, čímž podporuje buněčnou proliferaci (Meshinchi & Appelbaum, 2009). Přítomnost *FLT3-ITD* u pacientů AML indikuje horší prognózu v porovnání s pacienty bez této mutace (Abu-Duhier et al., 2000; Rombouts et al., 2000). *DNMT3A* je DNA methyltransferáza, která je zodpovědná za metylaci cytosinového zbytku na CpG dinukleotidech. Mutace v genu pro *DNMT3A* byla nalezena přibližně u 15-25 % pacientů s AML (Kihara et al., 2014; Ley et al., 2010) a je asociována se špatnou prognózou, s vyšší mírou relapsů a s krátkým celkovým přežitím (OS) pacientů (Shin et al., 2016).

Mezi nejčastější mutace v MDS a s-AML patří mutace genů *TET2* a *ASXL1*. *TET2* dioxygenáza je důležitá v udržování rovnováhy mezi přežitím, růstem a diferenciací normálních HSC (Delhommeau et al., 2009). Mutace v *TET2* je asociována s delším OS (Kosmider et al., 2009). Mutace v genu pro regulátor transkripce homeotických genů, *ASXL1*, má nepříznivý vliv na prognózu pacientů. Je spojována se sníženým OS (Thol et al., 2011). Obě tyto mutace se vyskytují přibližně u 20 % pacientů s MDS (Delhommeau et al., 2009; Thol et al., 2011)

V naší práci se zaměříme na mutace v genech pro isocitrát dehydrogenázu 1 (*IDH1*) a 2 (*IDH2*) (*IDH1/2*).

## 4 Isocitrát dehydrogenáza 1 a 2

### 4.1 Normální funkce Isocitrát dehydrogenáz

Enzym isocitrát dehydrogenáza se v buňce vyskytuje ve třech izoformách s různou lokalizací, IDH1 v cytosolu a peroxisomech, IDH2 a isocitrát dehydrogenáza 3 (IDH3) v mitochondriích. Dosud bylo identifikováno pět genů kódujících lidské IDH, z toho tři kódují podjednotky heterotetramerní IDH3 a zbylé dva kódují IDH1 a IDH2. Gen *IDH3A* lokalizován na chromozomu 9 kóduje dvě  $\alpha$ -podjednotky, *IDH3B* na chromozomu 13  $\beta$ -podjednotku a *IDH3G* na chromozomu X  $\gamma$ -podjednotku IDH3. Gen *IDH2* leží na chromozomu 15 a *IDH1* na chromozomu 2 (Al-Khallaf, 2017).

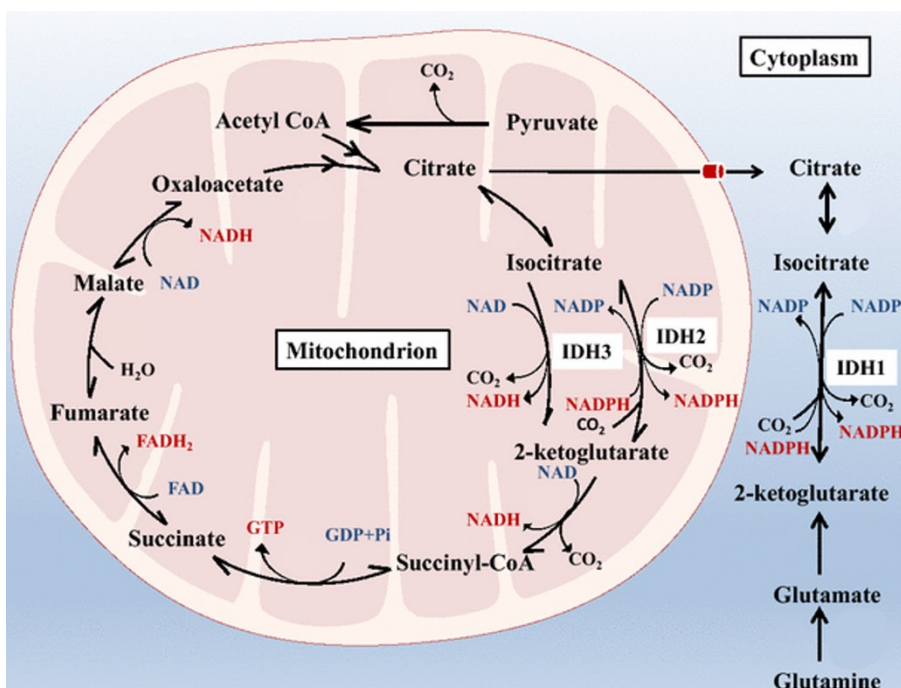
IDH1/2, které fungují ve formě homodimerů, katalyzují oxidativní dekarboxylaci isocitrátu na  $\alpha$ -ketoglutarát ( $\alpha$ -KG) za současné redukce nikotinamidadenindinukleotidfosfátu ( $\text{NADP}^+$ ) na redukovaný  $\text{NADP}^+$  ( $\text{NADPH}$ ) a jejich reverzní reakci, reduktivní karboxylaci. IDH3 se účastní citrátového cyklu, katalyzuje ireverzibilní reakci isocitrátu na  $\alpha$ -KG za současné redukce nikotinamidadenindinukleotidu ( $\text{NAD}^+$ ) na redukovaný  $\text{NAD}^+$  ( $\text{NADH}$ ). Liší se od izoform 1 a 2 zejména tím, že obsahuje regulační podjednotky, je tedy možné jeho funkci regulovat (Al-Khallaf, 2017).

IDH1 a 2 jsou důležitou součástí procesů v normálních, ale i nádorových buňkách. Mitochondriální IDH3 je inhibována zvýšenou hladinou  $\text{NADH}$  a adenosin-5'-trifosfátu (ATP) (Gabriel et al., 1985). Proto při zvýšeném poměru  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  v mitochondriích roste hladina isocitrátu. V těchto podmínkách se uplatňují zbylé dvě izoformy enzymu. Část isocitrátu je metabolizována v mitochondriích IDH2 za vzniku  $\text{NADPH}$ . Zbytek je konvertován na citrát reverzibilní akonitázou. Citrát je poté transportován do cytosolu, kde je buď přeměněn zpět na isocitrát a zpracován pomocí IDH1 opět na  $\text{NADPH}$  a  $\alpha$ -KG, nebo je metabolizován ATP citrát lyázou na acetylkoenzym A, který je využit v anaboličských procesech buňky (Al-Khallaf, 2017) (Obrázek 1).

IDH1/2 hrají důležitou roli i v nádorových buňkách, zvláště při zpomalení mitochondriální respirace, ať už z důvodu poškození respiračních komplexů anebo kvůli nedostatečnému okysličení buněk (Al-Khallaf, 2017). Při inhibici nebo poškození oxidativní respirace musí mít buňky záložní mechanismus pro tvorbu prekurzorů pro makromolekulární syntézu, jako je citrát. Za tímto účelem v těchto buňkách slouží reduktivní karboxylace závislá na glutaminu. Dochází k využití glutaminu pro syntézu  $\alpha$ -KG, který je reduktivní karboxylací pomocí IDH2 v mitochondriích a IDH1 v cytosolu přeměněn na isocitrát, prekurzor pro citrát (Wise et al., 2011). Citrát je po transportu do cytosolu využit pro anaboličké procesy, které jsou v nádorových buňkách maximalizovány, pro syntézu



mastných kyselin, fosfoglyceridů a cholesterolu, důležitých prekurzorů buněčných membrán (Al-Khallaf, 2017).



**Obrázek 1:** Funkce a lokalizace jednotlivých izoform IDH. Převzato z (Al-Khallaf, 2017) (pozměněno).

## 4.2 Mutace v genech *IDH1/2*

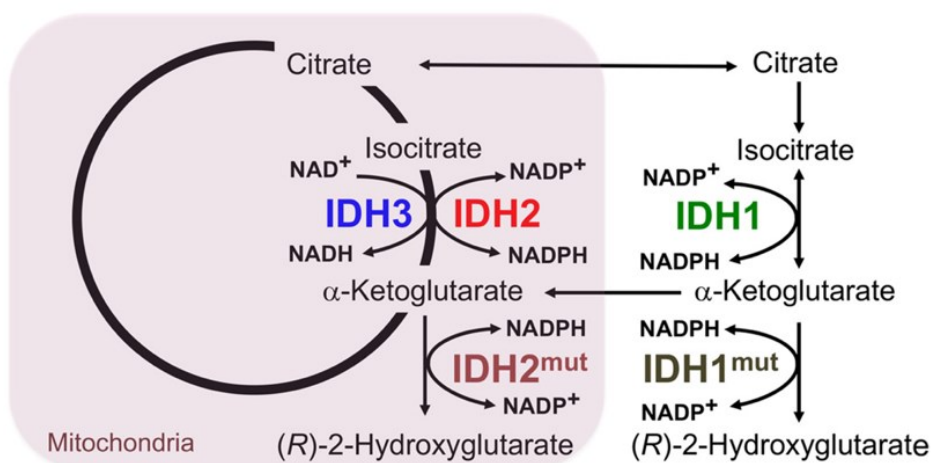
Mutace v genech kódujících enzymy IDH1/2 se nachází u různých typů nádorových onemocnění. Poprvé byly objeveny v gliomech v roce 2008 (Williams Parsons et al., 2008). U pacientů s AML byly odhaleny v roce 2009, kdy Mardis et al. pomocí paralelního DNA sekvenování AML genomu s normálním karyotypem identifikovali mutované (mut) *IDH1* u 16 ze 188 vzorků, kde u všech byla nalezena záměna argininu v pozici 132 za cystein, histidin nebo serin. Později byly objeveny mutace i genu kódujícím mitochondriální IDH2. Ward et al. v roce 2010 prokázali výskyt *IDH1/2* mutací u 23 % (18 ze 78) pacientů s AML. Na rozdíl od mutovaných IDH v gliomech se u AML signifikantně běžněji vyskytují mutace v izoformě IDH2 než IDH1 (Ward et al., 2010).

Kosmider et al. v roce 2010 našli mutované IDH1/2 v 5 % MDS, 8,8 % MDS/MPN a v 9,7 % s-AML. Tyto mutace byly vždy heterozygotní a vzájemně se vylučující.

### 4.3 Funkce mutovaných IDH1/2

Mutace IDH1/2 je způsobená specifickou záměnou klíčových argininů za jiné aminokyselinové zbytky. Jedná se o R132 u IDH1 a R140 a R172 u IDH2 (Ward et al., 2010; Yan et al., 2009). U akutních myeloidních leukémií je u mutovaných IDH1 R132 nejčastěji substituován histidinem a cysteinem (Dang et al., 2009; Mardis et al., 2009), u mutovaných IDH2 je obvykle R140 nahrazen glutaminem a R172 lysinem (C. L. Green et al., 2011; Ward et al., 2013). Záměna argininu v aktivním místě enzymu způsobí snížení afinity IDH1 pro isocitrát (S. Zhao, Lin, Xu, Jiang, Zhai, et al., 2009), což vede ke ztrátě schopnosti katalyzovat oxidativní dekarboxylaci isocitrátu na  $\alpha$ -KG (Yan et al., 2009). Zároveň bylo zjištěno, že mutované enzymy IDH1 a IDH2 katalyzují ireverzibilní reakci  $\alpha$ -KG na nový produkt, (D)2-hydroxyglutarát ((D)-2HG), za současné spotřeby NADPH (Dang et al., 2009; Ward et al., 2010) (Obrázek 2).

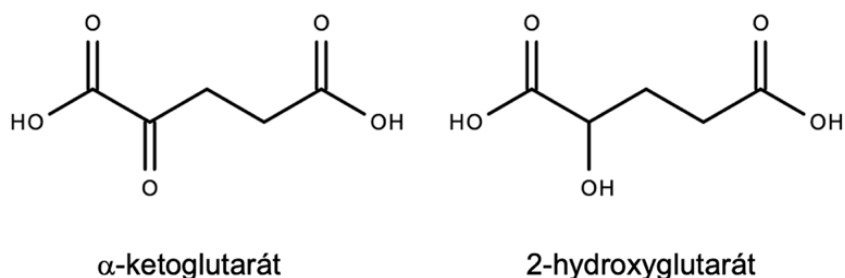
IDH1 mutace je vždy heterozygotní a IDH funguje ve formě dimerů. Proto se teoreticky bude v buňkách vyskytovat 25 % wild-type/wild-type (wt/wt) homodimerů, 25 % mut/mut homodimerů a 50 % mut/wt heterodimerů (S. Zhao & Guan, 2010). U heterodimeru mut/wtIDH1 v cytosolu je neomorfní enzymatická aktivita závislá na normální aktivitě wt podjednotky, jejíž reakce produkuje potřebné NADPH a  $\alpha$ -KG. (Dang et al., 2009; Ward et al., 2013). Naopak pro neomorfní aktivitu mitochondriálních mutIDH2 nejspíš není aktivita wt enzymu potřeba, protože v mitochondriích je hladina  $\alpha$ -KG udržována různými anaplerotickými reakcemi a obvykle se tam vyskytuje větší poměr NADPH/NADP<sup>+</sup> (Ward et al., 2013), zejména díky proton-translokujícím transhydrogenázám (Rydström, 2006).



**Obrázek 2:** Znázornění vnitrobuněčné lokalizace a chemických reakcí katalyzovaných wild-type a mutovanými IDH. Převzato z (Tommasini-Ghelfi et al., 2019).

#### 4.4 Role (D)-2hydroxyglutarátu v leukemogenezi

Nově vznikající produkt (D)-2HG je onkometabolit. Jeho hladina je za normálních okolností regulována enzymy 2-Hydroxyglutarát dehydrogenázami, které jej přeměňují zpět na  $\alpha$ -KG (Achouri et al., 2004). (D)-2HG je dikarboxylová kyselina složená z 5 uhlíků. Od  $\alpha$ -KG se liší hydroxylovou skupinou na 2., chirálním, uhlíku, která nahrazuje ketonovou skupinu u  $\alpha$ -KG. Chemické vzorce těchto dvou látek jsou znázorněny na Obrázek 3.



**Obrázek 3:** Chemický vzorec  $\alpha$ -ketoglutarátu ( $\alpha$ -KG) a 2-hydroxyglutarátu (2-HG)

Na základě této strukturní podobnosti (D)-2HG v tumorogenezi kompetitivně inhibuje  $\alpha$ -KG dependentní dioxygenázy, včetně histon demethyláz, TET 5-methylcytosin hydroxyláz a proteinů obsahujících prolylhydroxylázovou doménu (PHD) (W. Xu et al., 2011; S. Zhao et al., 2009). Tato inhibice může vést ke změnám exprese genů důležitých ve fyziologických procesech buněk, čímž může (D)-2HG přispívat k jejich maligní transformaci.

(D)-2HG potlačuje aktivitu  $\alpha$ -KG dependentních TET 5-methylcytosin hydroxyláz (W. Xu et al., 2011). TET katalyzují přeměnu 5-methylcytosinu na 5-hydroxymethylcytosin a jsou důležité v demethylaci DNA v oblastech CpG ostrůvků (Tahiliani et al., 2009). Inhibice těchto enzymů vede k hypermethylaci DNA (Figuroa et al., 2010) a je asociována s krevními nádorovými onemocněními (Tahiliani et al., 2009).

Histon demethylázy obsahující Jumonji C (JmjC) doménu jsou dalším z inhibičních cílů (D)-2HG. Jsou to enzymy modifikující chromatin, které odstraňují methylovou skupinu z histonů, a tím kontrolují genovou expresi (Chowdhury et al., 2011). Jejich inhibice vede ke zvýšené methylaci histonů (W. Xu et al., 2011). Demethylace histonů je důležitá pro diferenciaci progenitorových buněk, jejich inhibice tedy způsobuje narušení myeloidní diferenciaci (Lu et al., 2012).

Proteiny obsahující PHD, které podporují degradaci hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) prostřednictvím hydroxylace, jsou také závislé na  $\alpha$ -KG. HIF-1 $\alpha$  je součástí HIF-1, což je transkripční faktor, regulující důležité metabolické procesy při hypoxii, které jsou klíčové pro

nádorový růst. Hladina tohoto faktoru je u mutovaných IDH1 zvýšená, což indikuje možnou inhibici proteinu obsahujícího PHD onkometabolitem (D)-2HG. Tato inhibice vede tedy ke stabilizaci HIF-1 $\alpha$ , čímž může přispívat k tumorigenezi prostřednictvím aktivace HIF-1 $\alpha$  dráhy, která aktivuje expresi genů důležitých pro nádorový růst (S. Zhao et al., 2009).

#### 4.5 Vliv IDH1/2 mutací na prognózu pacientů

Mutace v genech pro IDH1 nebo 2 u AML jsou obvykle asociovány s vyšším věkem pacientů, s nižší hladinou leukocytů a s vyšší průměrnou hladinou krevních destiček než *wtIDH*. Nejčastěji se vyskytují u pacientů s cytogeneticky normální AML (CN-AML) (S. Abbas et al., 2010; Paschka et al., 2010). Ve studii Paschka et al. z roku 2010 se nejvíce vyskytovaly u CN-AML spolu s mutacemi v *NPM-1* a byly asociovány s horší prognózou u AML s mutovanými *NPM-1* bez *FLT3-ITD*. Různé studie však popisují odlišné výsledky výzkumu vlivu IDH mutací na prognózu u AML. Patel et al. v roce 2012 popsali souvislost mutace v *IDH2* se zvýšeným OS. Dále zjistili, že pacienti AML se středním rizikem (IR-AML), kteří zároveň nesli mutace i v *NPM1* i v *IDH1* nebo 2, vykazovali vyšší OS (89 %) ve srovnání s pacienty s mutNPM1 a wtIDH (31 %). V jiné studii byli schopni najít signifikantní vliv na prognózu až při analýze mutIDH1 a 2 separátně (Q. Xu et al., 2017). U pacientů s mutIDH1 popsali nižší OS a přežití bez příhody (EFS) než u wtIDH1. Naopak u pacientů s mutIDH2 objevili prodloužení OS, které bylo signifikantní zejména u pacientů IR-AML. Ve studii z roku 2020 Sara Zarnegar-Lumley et al. uvedli, že samotná mutace nepředvídá výsledek onemocnění u pacientů s AML. EFS pacientů s mutIDH se signifikantně nelišilo od EFS u pacientů bez mutací v těchto enzymech (39 % pro mutIDH a 40 % pro wtIDH). Přišli však na to, že při současné mutaci *NPM1* došlo ke zvýšení EFS (76 % pro mutNPM1/mutIDH a 24 % pro mutIDH/wtNPM1), což tedy znamenalo lepší prognózu. Tento objev byl signifikantní u pacientů do 60 let. Pokud nesli navíc mutaci v *DNMT3A*, tzn. mutIDH/mutNPM1/mutDNMT3A, došlo u pacientů ve středním věku (30-59 let) opět ke zhoršení prognózy oproti mutIDH/mutNPM1, EFS kleslo z 57 % na 25 % (Sara Zarnegar-Lumley et al., 2020). Z této studie tedy vyplývá, že vliv IDH mutací na prognózu u AML závisí na kontextu, na dalších mutacích vyskytujících se zároveň s mutacemi v IDH1 nebo 2.

Na základě dosavadních výsledků není možné vyvodit jednoznačný závěr co se týče vlivu mutací v genech pro enzymy IDH1 a 2 na prognózu u pacientů s AML. Většinou se však studie shodují v tom, že IDH2 mutace je asociována s lepší prognózou onemocnění (A. Green & Beer, 2010; Patel et al., 2012; Q. Xu et al., 2017).

## 4.6 Vývoj léčiv cílených na mutované IDH1/2

Objev častých výskytů IDH mutací v rakovinných onemocněních vedl k vývoji léků cílených na inhibici onkogenního mechanismu působení těchto mutovaných enzymů. Prvním schváleným lékem pro pacienty s AML s mutIDH2 je Enasidenib (také IDHIFA, AG-221). Je to selektivní alosterický inhibitor mutIDH2. Naváže se na místo na enzymu a stabilizuje jeho otevřenou konformaci, čímž znemožní syntézu (D)-2HG. Normalizuje hladinu (D)-2HG v buňkách, což vede k obnově myeloidní diferenciace (Yen et al., 2017).

Ivosidenib (také TIBSOVO, AG-120) je alosterický inhibitor mutIDH1 (Popovici-Muller et al., 2018). Soutěží o navázání na konkrétní místo v enzymu s hořčnatými ionty, které jsou důležitými kofaktory mutIDH1. Tímto navázáním brání průběhu neomorfní reakce (Deng et al., 2015). Stejně jako Enasidenib snižuje hladinu (D)-2HG, a tím obnovuje myeloidní diferenciaci (Popovici-Muller et al., 2018).

Další inhibitory mutIDH u AML jsou ve vývoji. Zároveň také probíhají klinické studie Enasidenibu a Ivosidenibu v kombinaci s dalšími již osvědčenými léky, jako je např. hypometylační činidlo Azacytidin (DiNardo et al., 2019; MacBeth et al., 2021).

## 5 Redoxní metabolismus

Oxidačně/redukční (redoxní) homeostáza je rovnováha mezi produkcí a eliminací ROS. Tyto látky hrají roli v důležitých fyziologických procesech, jako je imunitní obrana nebo redoxní signalizace. Mezi nejčastěji vyskytované ROS v buňkách patří superoxidový radikál, peroxid vodíku, hydroxylový radikál, singletový kyslík a další. Zvýšená koncentrace ROS, která je charakteristická pro rakovinné buňky, vede k narušení buněčné redoxní rovnováhy a k navození oxidačního stresu, při kterém mohou tyto vysoce reaktivní látky poškodit biologické makromolekuly, a postupně způsobit smrt buňky (Valko et al., 2007). Proto eukaryotické organismy vyvinuly několik mechanismů pro eliminaci ROS, které se společně nazývají buněčný antioxidační obranný systém.

### 5.1 Reaktivní kyslíkaté a dusíkaté látky

Jedním z hlavních zdrojů ROS v buňkách je mitochondriální respirační řetězec. Funguje na principu přenosu elektronů z redukovaného koenzymu NADH a flavinadenindinukleotidu (FADH<sub>2</sub>) přes 4 proteinové komplexy na terminální akceptor elektronů, kyslík, který je redukován na vodu. Zároveň vzniká protonový gradient přes vnitřní mitochondriální membránu, který je posléze využit na produkci ATP. Během transportu elektronů však může dojít k předčasnému uvolnění elektronu

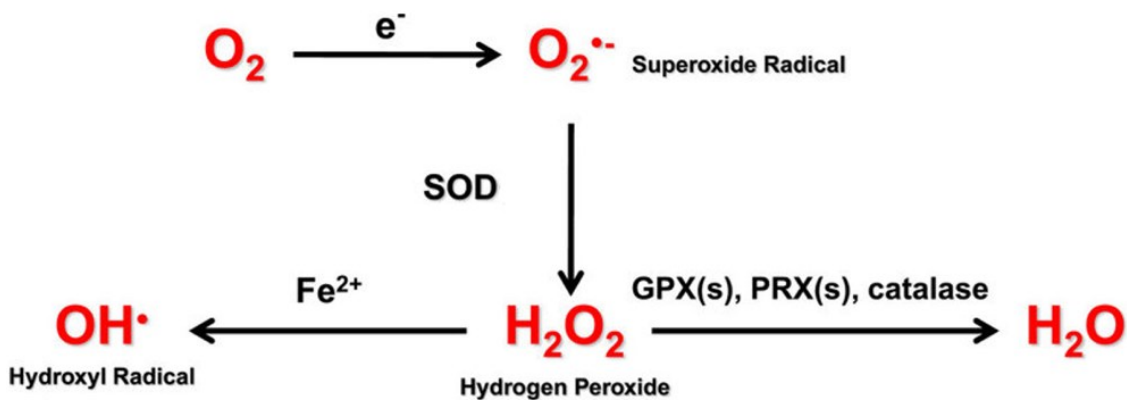
z komplexu I nebo III a k redukci kyslíku na superoxidový radikál a dále na peroxid vodíku (R. Z. Zhao et al., 2019). Dalším hlavním producentem ROS jsou NADPH oxidázy (NOX), transmembránové proteiny, které transportují elektrony z cytoplazmatického NADPH přes FAD a dva hemové kofaktory přes membrány na kyslík za vzniku superoxidového radikálu (Magnani & Mattevi, 2019).

Hlavním představitelem reaktivních dusíkatých látek (RNS) je oxid dusnatý. Jeho produkci v buňkách zprostředkovávají NO syntázy, které katalyzují přeměnu L-argininu, NADPH a molekulárního kyslíku na L-citrulin, NADP<sup>+</sup> a oxid dusnatý. Oxid dusnatý je poměrně stabilní, přesto ale může reagovat s molekulárním kyslíkem za vzniku radikálu oxidu dusičitého. Tento radikál se může spojit s dalším stejným radikálem a vytvořit oxid dusitý. V přítomnosti superoxidového radikálu probíhá reakce s oxidem dusnatým na peroxyinitrit (Paulsen & Carroll, 2013).

ROS a RNS ve vysokých koncentracích způsobují závažná poškození v buňce. Tyto reaktivní látky mohou vázat proteiny, lipidy i nukleové kyseliny, čímž mění jejich strukturu a funkci. Dochází k peroxidaci lipidů za vzniku malondialdehydů nebo 4-hydroxy-2-nonenalů, což jsou mutagenní a toxické látky. Může dojít k strukturní modifikaci DNA, která vede k mutagenézím a posléze ke karcinogenezi. Hrozí přímé poškození DNA od bodových mutací v menším rozsahu až po alterace na úrovni chromosomálních přestaveb. ROS i RNS také oxidují proteiny, především jejich cysteinové nebo methioninové zbytky, což může způsobit nevratné změny a vést ke ztrátě funkce proteinu a jeho následné degradaci (Valko et al., 2007). Aby těmto závažným poškozením buňka zabránila, potřebuje speciální systémy, které ji před nimi ubrání – antioxidační systém.

## 5.2 Antioxidační systém buněk

Hladina ROS je za fyziologických podmínek udržována antioxidačními enzymatickými systémy buňky. Superoxidový radikál může být přeměněn spontánně nebo za katalýzy superoxid dismutázou (SOD) na peroxid vodíku a kyslík. Peroxid vodíku je mírný oxidant, jehož koncentrace je v buňce regulována enzymy Katalázou, Peroxiredoxinovým (PRx) a Glutathion peroxidázovým (GPx) enzymatickým systémem, které jej přemění na vodu. Peroxid vodíku, který není úspěšně eliminován, může reagovat se stopovými kovovými ionty za vzniku hydroxylového radikálu, což je velmi reaktivní oxidant, jehož hladina v buňce není žádným známým mechanismem regulována (Paulsen & Carroll, 2013) (Obrázek 4).



**Obrázek 4:** Hlavní představitelé ROS a reakce antioxidačního systému buňky. Převzato z (Sullivan & Chandel, 2014).

Jak již bylo zmíněno, superoxidový radikál může reagovat s oxidem dusnatým na peroxyntit, který je velmi reaktivní a nebezpečný pro buněčné struktury (Niles et al., 2006; Rubbosi et al., 1994; Salgo et al., 1995). Proto je důležitá role superoxid dismutázy, která představuje klíčovou obranu buňky proti kyslíkatým volným radikálům. Doposud jsou známé tři izoformy, které se liší v lokalizaci a v kovovém kofaktoru, který vyžadují pro svou katalytickou činnost, cytosolická Cu/ZnSOD (SOD1) (Crapo et al., 1992), mitochondriální MnSOD (SOD2) (Karnati et al., 2013) a extracelulární Cu/ZnSOD (SOD3) (Marklund et al., 1982). Kataláza působí v cytosolu a peroxisomech, kde udržuje nízkou hladinu peroxidu vodíku.

Dva důležité antioxidační enzymatické systémy jsou systém PRx a GPx. Rozkládají peroxid vodíku na vodu mechanismem zahrnujícím oxidaci cysteinu v aktivním místě enzymu. PRx je oxidován za současné redukce peroxidu vodíku. Oxidovaný PRx je poté redukován thioredoxinem, který pro svou redukci pomocí thioredoxin reduktázy využívá vlastní volné thiooly. GPx využívá pro svou redukci polypeptid glutathion. Oba enzymy pro regeneraci vyžadují NADPH (Liou & Storz, 2010). NADPH je hlavním redukčním činidlem v buňkách a je klíčový pro správnou funkci antioxidačního systému. NADPH neproniká přes mitochondriální membránu, a proto každý enzym, který jej syntetizuje, přispívá ke dvěma hlavním poolům NADPH v buňkách: cytosolovému a mitochondriálnímu (Ying, 2007). Nedostatek NADPH vede ke špatné regeneraci antioxidačních enzymů, a tedy ke zvýšené hladině ROS uvnitř buněk. To může způsobit nevratná poškození, ale zároveň narušit důležitý způsob redoxní signalizace.

### 5.3 Vliv IDH mutací na redoxní homeostázu

Bylo prokázáno, že mutace IDH1/2 přímo ovlivňují oxidačně/redukční (redoxní) stav v nádorových buňkách (Shi et al., 2014; Tang et al., 2020). Zatímco wtIDH1/2 se významně podílí na hladině NADPH v cytosolu a mitochondriích, jejich mutované varianty mají podstatně sníženou schopnost produkovat NADPH a místo toho spotřebovávají značné množství NADPH (Gelman et al., 2018; Tang et al., 2020). Buňky s mutovanou IDH se snaží přeprogramovat svůj metabolismus tak, aby udržely buněčný NADPH/NADP<sup>+</sup> v rovnováze a udržely tak redoxní homeostázu. Přesun energetického metabolismu na pentosofosfátovou dráhu, závislost na glutamátu nebo zvýšená aktivita nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), regulátoru buněčné odpovědi na oxidační stres, jsou často pozorované kompenzační mechanismy u buněk s mutIDH1/2 (Gelman et al., 2018; Tang et al., 2020; Tiburcio et al., 2020). Zdá se však, že tyto mechanismy nestačí k plné kompenzaci spotřeby NADPH, a kladou tak na tyto buňky vysoké metabolické nároky, což je činí zranitelnějšími vůči oxidačnímu stresu (Gelman et al., 2018). Změny v redoxní homeostáze vyvolané mutovanými IDH1 nebo IDH2 navíc přetrvávají, i když mutace již není přítomna, a proto se obecně uznává, že přeprogramování redoxní sítě iniciuje adaptační mechanismy předcházející vzniku rezistence k inhibitorům IDH (Mugoni et al., 2019).

### 5.4 Vliv redoxního prostředí na proteom

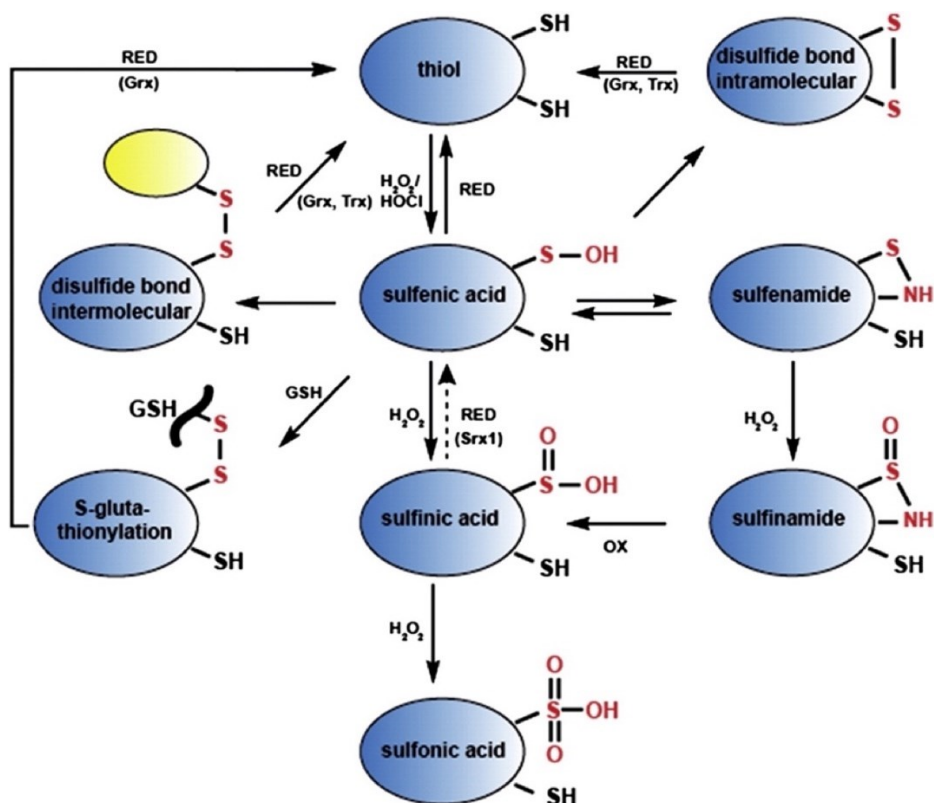
ROS nejsou pouze škodlivými vedlejšími produkty metabolismu, ale v nízkých netoxických koncentracích hrají důležitou roli ve fyziologických procesech. Příkladem je buněčná signalizace, ve které působí jako sekundární posli (Paulsen & Carroll, 2013).

Schreck et al. v roce 1991 zjistili, že peroxid vodíku, který je volně permeabilní přes membránu, specificky aktivuje transkripční nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B). Později byly objeveny další důležité transkripční faktory, regulovatelné ROS (Myrset et al., 1993; Wasylyk & Wasylyk, 1993). Redoxní regulaci řady z nich (AP-1, NRF2, CREB, HSF1, HIF-1, TP53, NF- $\kappa$ B, NOTCH, SP1 and SCREB-1) ve zkratce popsali v roce 2014 Marinho et al. Přestože je nejčastěji s buněčnou signalizací asociován peroxid vodíku, důležitou roli hrají i jiné ROS a RNS. Několik studií popisuje například klíčovou roli superoxidového radikálu (Huang et al., 2002; Winterbourn & Metodiewa, 1999).

Redoxní signalizace funguje na principu místně specifické posttranslační modifikace signálních proteinů. ROS oxidují aminokyselinové zbytky, nejčastěji thiolové skupiny cysteinů. Oxidační modifikace thiolů je regulována sensitivitou proteinů obsahujících cysteinové zbytky k ROS. Ta se liší v závislosti na jejich ionizační konstantě (pKa), jelikož reakce probíhá mechanismem nukleofilního ataku thiolu na peroxid vodíku, thioly s nižší pKa jsou reaktivnější (Little & O'Brien,



1969; Winterbourn & Metodiewa, 1999). Dále pak přístupností volných thiolových skupin a koncentrací ROS v jejich blízkosti. Reakcí ROS s volnými thioley vzniká celá škála posttranslačních modifikací, viz Obrázek 5. Reakcí volných thiolů s peroxidem vodíku dochází k reverzibilní oxidaci thiolu na kyselinu sulfenovou. Při větším přebytku peroxidu vodíku však může dojít k ireverzibilní přeměně thiolu na kyselinu sulfinovou a poté na kyselinu sulfonovou (Davis & Billmers, 1981; Little & O'Brien, 1969). Výjimkou jsou určité PRx, u kterých je přeměna na kyselinu sulfinovou reverzibilní (Hyun et al., 2005). Kyselina sulfenová je nestabilní, a tedy velmi reaktivní. Existuje jen několik případů, kdy byla nalezena v buňce za fyziologických podmínek (Nakamura, 1983; Pal et al., 1969). Kyselina sulfenová může reagovat s okolními thioley na stejném proteinu za tvorby intramolekulárních disulfidických můstků, nebo na odlišném proteinu, což má za následek tvorbu intermolekulárních disulfidických můstků (Rehder & Borges, 2010). Může formovat cyklické sulfenamidy s dusíky okolních aminokyselin (Yang et al., 2007). Kyselina sulfenová může také podléhat S-glutathionylaci, což je tvorba disulfidického můstku mezi sulfidem cysteinu na tripeptidu glutathionu a sulfidem kyseliny sulfenové (Barrett et al., 1999). Glutathionylace ale může probíhat i bez intermediátu kyseliny sulfenové přímo z thiolů, přes thiosulfinátové intermediáty nebo přes thiol radikály. Různé potenciální mechanismy S-glutathionylace proteinů byly popsány autory Mieyal et al. v roce 2008. RNS také zprostředkovávají modifikace thiolů cysteinů, a to mechanismem S-nitrosylace (Stamler et al., 1992). Tyto thiolové modifikace je možné zvrátit zpětnou reakcí pomocí antioxidačních systémů, zejména thioredoxinu a glutaredoxinu. Například reverzní reakce glutathionylace, deglutathionylace, je ve většině případech katalyzována glutaredoxinem (Mieyal & Gravina, 1993; Peltoniemi et al., 2006). Byly však popsány případy, kdy probíhá i za pomoci thioredoxinu, proteinu disulfid isomerázy (Jung & Thomas, 1996) či sulfiredoxinu (Park et al., 2009).



**Obrázek 5:** Přehled posttranslačních modifikací cysteinových thiolů proteinů prostřednictvím ROS. Hlavními produkty těchto reakcí jsou kyselina sulfenová, částečně ireverzibilní kyselina sulfinová a kompletně nevratná kyselina sulfonová. Dochází k S-glutathionylaci, k tvorbě intramolekulárních či intermolekulárních disulfidických můstků nebo cyklických sulfenamidů a dále sulfinamidů. Převzato z (Groitl & Jakob, 2014).

Oxidace cysteinových thiolů vede k tvorbě mnoha různých produktů a umožňuje buňkám rozpoznat změny v redoxní rovnováze a proteinům přizpůsobit se aktuálnímu redoxnímu prostředí v buňce (Groitl & Jakob, 2014). Prostřednictvím těchto modifikací může být ovlivněna struktura a funkce proteinů. Tato redoxní regulace enzymů je důležitá v mnoha klíčových metabolických drahách. Příkladem je regulace komplexu II respiračního řetězce. Pro jeho správnou funkci je nutná S-glutathionylace cysteinu na 70 kDa podjednotce, která váže její substrát FAD (Y. R. Chen et al., 2007). Dalším příkladem je hexokináza, která katalyzuje fosforylaci glukózy na glukóza-6-fosfát a jako důležitého enzymu glykolýzy je její funkce přísně regulovaná. Oxidace thiolů hexokinázy 2 inhibuje její aktivitu (Xiao et al., 2020). Dále ROS prostřednictvím redoxní signalizace inhibují progresi buněčného cyklu (Deshpande et al., 2002; Li et al., 2009), vyvolávají apoptózu buňky (Deshpande et al., 2002; Jiang et al., 2003) nebo ovlivňují míru degradace proteinů (Davies & Goldberg, 1987; Fligiel et al., 1984).

## 6 Role redoxní homeostázy v hematopoeze

Podstatou krvetvorby je unikátní schopnost sebeobnovy a diferenciaci HSC lokalizovaných na vrcholu hematopoetické hierarchie do různých typů krevních buněk. HSC sídlí v kostní dřeni, kde se asymetricky dělí, za vzniku další multipotentní HSC a buňky diferencované, která již schopnost sebeobnovy nemá. Tyto progenitorové buňky jsou posléze základem buněčných linií (Orkin & Zon, 2008). Přibývá stále více důkazů o tom, že udržování redoxní homeostázy v HSC hraje důležitou roli v jejich správné funkci, a tím i v krvetvorbě. Regulace redoxní homeostázy v HSC závisí jednak na mikroprostředí, ve kterém se nacházejí, tzv. niche (Orkin & Zon, 2008), ale také na produkci a eliminaci ROS intracelulárně.

### 6.1 Role mikroprostředí kostní dřene na hladinu ROS v HSC

HSC v klidovém stádiu přebývají v kostní dřeni v hypoxických podmínkách. Hypoxické prostředí je důležité pro udržení HSC v  $G_0$  fázi buněčného cyklu (Hermitte et al., 2006), a také přispívá k udržení nízké hladiny ROS. Udržování nízké hladiny ROS je klíčové pro sebeobnovu HSC. Vypovídá o tom např. práce Jang & Sharkis z roku 2007, kde autoři definovali dvě populace HSC podle intracelulární hladiny ROS:  $ROS^{low}$  a  $ROS^{high}$  a zjistili, že  $ROS^{low}$  populace vykazuje větší schopnost sebeobnovy. Naopak u  $ROS^{high}$  docházelo k diferenciaci a postupnému vyčerpání kmenových buněk (Jang & Sharkis, 2007). Jang & Sharkis také uvedli, že  $ROS^{low}$  HSC se vyskytují v osteoblastické (endosteální) niche s nízkou hladinou kyslíku a navrhli, že aktivace HSC, která vede k jejich diferenciaci, je iniciována jejich translokací do mikroprostředí s vyšší hladinou kyslíku, do vaskulární niky. To naznačuje, že hladina ROS přímo úměrně souvisí s mírou diferenciaci HSC a přechodem klidových HSC do aktivního stavu, ve kterém jsou schopny dělit se a diferencovat v případě, kdy je potřeba doplnit krevní pool (Cao et al., 2016; Kubota et al., 2008; Takubo et al., 2010). Z toho plyne, že hladina kyslíku v mikroprostředí, ve kterém se buňky nacházejí, je důležitým faktorem regulujícím jejich aktivitu.

### 6.2 Intracelulární zdroje ROS v HSC

Mezi hlavní intracelulární zdroje ROS u HSC patří, jak již bylo zmíněno výše, mitochondriální dýchací řetězec. HSC mají relativně nízkou mitochondriální aktivitu a nízký mitochondriální membránový potenciál a při tvorbě energie spoléhají hlavně na anaerobní glykolýzu (Simsek et al., 2010). Tak udržují nízké hladiny ROS, které jsou zásadní pro jejich schopnost sebeobnovy a pluripotence (Maryanovich et al., 2015; Takubo et al., 2013). Nicméně

upregulace mitochondriální aktivity v součinnosti se zvýšenou hladinou ROS je klíčová pro diferenciaci HSC a poškození oxidativní fosforylace nebo podání antioxidantů vede k narušení tohoto procesu (C. Chen et al., 2008; Maryanovich et al., 2015; Yu et al., 2013).

Dalším klíčovým zdrojem ROS u HSC jsou enzymy NOX, konkrétně izoformy NOX1, NOX2 a NOX4. Jejich aktivita se zdá být v malé míře konstitutivní i v klidových HSC, které jsou vybaveny systémy kontrolujícími tuto nízkou produkci ROS, jako je např. SOD3 (Piccoli et al., 2005, 2007). Aktivitu těchto enzymů však lze i stimulovat. Míra exprese podjednotek NOX2 se v průběhu diferenciaci buněk zvyšuje (Dakik et al., 2021). Zdá se, že aktivita NOX1 a NOX2 je stimulována prostřednictvím signálních drah aktivovaných pomocí ROS (Piccoli et al., 2007), což naznačuje přítomnost mechanismu pozitivní zpětné vazby.

### 6.3 Kontrola hladiny ROS v HSC

Pro funkční hematopoézu je tedy důležité udržovat nízkou hladinu ROS, a tím udržovat HSC v klidovém stádiu, dokud není potřeba doplnit krevní pool. Pro udržení nízké hladiny ROS jsou důležité antioxidantní systémy. Saretzki et al. zjistili, že během diferenciaci dochází k utlumení antioxidantní a antistresové obrany, což potvrzuje fakt, že se HSC během tohoto procesu vyskytují v prostředí s vyšší koncentrací ROS (Saretzki et al., 2004). Produkci a eliminaci ROS v HSC kontrolují speciální transkripční faktory a signální dráhy citlivé na redoxní změny (tzv. redoxní sensory) jako jsou například subrodina transkripčních faktorů Forkhead O (FoxO), Ataxia telangiectasia mutated (ATM) nebo Kelch-like ECH associated protein 1 (KEAP1) (Essers et al., 2004; Guo et al., 2010; Paul et al., 2014).

Tothova et al. (2007) delemovali FoxO1, FoxO3 a FoxO4 v dospělém hematopoetickém systému a ukázali, že myši bez těchto transkripčních faktorů vykazovaly zvýšení hladiny ROS. Tato delece vedla k redukcii počtu HSC, způsobené zvýšenou diferenciací a nedostatečnou sebeobnovou těchto buněk. Po podání antioxidantu N-acetylcysteinu (NAC) došlo k obnově fenotypu HSC, což indikuje, že způsobené poškození souvisí se zvýšenou hladinou ROS a FoxO transkripční faktory jsou tedy důležité v obraně proti nim. FoxO totiž aktivují klíčové antioxidantní systémy v buňkách, MnSOD (Kops et al., 2002) a katalázu (Tan et al., 2008), a také hrají důležitou roli v opravě poškozené DNA (Tran et al., 1999). FoxO transkripční faktory jsou regulované prostřednictvím různých posttranslačních modifikací. Příkladem je signální dráha PI3K/Akt, která je aktivovaná např. růstovými faktory během HSC diferenciaci (Miyamoto et al., 2007). Akt fosforyluje FoxO v jádře, což vede k jeho translokaci do cytoplazmy, a tedy zabránění jeho aktivitě v regulaci exprese genů (Brunet et al., 1999). U HSC v klidové fázi je PI3K/Akt dráha reprimována, FoxO transkripční faktory

se vyskytují v jádře, kde mohou regulovat transkripci a bránit buňku před akumulací ROS (Yamazaki et al., 2006). FoxO ovšem mohou být aktivovány signálními dráhami zprostředkovanými zvýšenou hladinou ROS. Příkladem je fosforylace prostřednictvím c-Jun N-terminal kinase (JNK). Ve studii Essers et al. z roku 2004 přišli na to, že po vyvolání mírného oxidačního stresu podáním peroxidu vodíku v buňkách došlo k aktivaci malé RAS like (Ral) GTPase, ta fosforyluje a aktivuje JNK, která fosforyluje specifická místa na FoxO4. Tím zprostředkovává translokaci FoxO4 do jádra a aktivuje jeho transkripční aktivitu. Při aktivaci této signální dráhy zvýšenou hladinou ROS tedy dochází k FoxO-zprostředkované aktivaci transkripce genů pro antioxidační obranu buňky (Essers et al., 2004). Tyto transkripční faktory jsou tedy přímými redoxními sensory.

ATM hraje roli v udržování stabilního genomu a je také důležitý pro regulaci hladiny ROS v HSC (Ito et al., 2004). Ito et al. v roce 2004 popsali zvýšení hladiny tumorových supresorů p16<sup>INK4a</sup> a p19<sup>ARF</sup> v buňkách s deficitním ATM, které vede k narušení funkce HSC. Po podání NAC se jejich hladina opět snížila, což implikuje, že zvýšení bylo v důsledku akumulace ROS a že ATM protein kináza je důležitá v regulaci jejich hladiny (Ito et al., 2004). ATM je přímo aktivována prostřednictvím redoxní signalizace, je tedy dalším z redoxních sensorů. V přítomnosti ROS dochází k tvorbě dimerů ATM spojených intermolekulárními disulfidickými můstky (Guo et al., 2010). Alexander et al. (2010) ve své studii prokázali funkci ATM v obraně proti ROS. Zjistili, že aktivace ATM v odpovědi na zvýšenou hladinu ROS vede k aktivaci tuberous sclerosis complex 2 (TSC2), což je tumorový supresor, který inhibuje aktivitu mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) (Alexander et al., 2010). Mammalian target of rapamycin (mTOR) zaujímá důležitou funkci v hematopoéze a v udržování HSC v klidovém stavu. Jelikož aktivace mTOR je asociována se zvýšenou produkcí ROS v HSC (Jang & Sharkis, 2007), TSC prostřednictvím inhibice mTOR (Inoki et al., 2002) reguluje hladinu ROS v těchto buňkách (C. Chen et al., 2008). TSC2 je inaktivován PI3K/Akt dráhou, což pozastavuje inhibici mTOR (Inoki et al., 2002; Manning et al., 2002). PI3K/Akt dráha je negativně regulovaná tumor supresorovým genem Phosphatase and tensin homolog (*PTEN*) (Stambolic et al., 1998), který je inhibován prostřednictvím ROS (Lee et al., 2002). Zhang et al. (2006) pozorovali u myši s mutovaným *PTEN* snížení počtu HSC v klidové fázi a ukázali, že tato mutace vede k mobilizaci HSC z kostní dřeně do periferní krve a do sleziny, což má za následek jejich vyčerpání. V případě mutovaného *PTEN* dochází ke konstitutivní aktivitě dráhy PI3K/Akt, která způsobuje depleci HSC a vede k rozvoji nádorových onemocnění (Kharas et al., 2010). Toto narušení funkce HSC, pozorované i ve studii Yilmaz et al. (2006), bylo možné zvrátit podáním inhibitoru mTOR, rapamycinu, což značí, že bylo zprostředkováno kinázou mTOR (Yilmaz et al., 2006).

Keap1/Nrf2 systém hraje klíčovou roli v hematopoéze. U myši s deficitním proteinem Keap1 dochází k neustálé aktivaci Nrf2, což vede k indukci vstupu HSC do buněčného cyklu za účelem

diferenciace. Správná rovnováha aktivity Nrf2 a její regulace proteinem Keap1 je tedy důležitá v regulaci HSC (Murakami et al., 2017). Zvýšená hladina ROS inaktivuje Keap1, čímž aktivuje Nrf2 (Murakami et al., 2017; Paul et al., 2014) a vede tedy k přechodu HSC z klidového stavu a k jejich diferenciaci. Nrf2 zároveň aktivuje expresi genů kódujících proteiny důležité v antioxidační obraně buňky (Itoh et al., 1997).

### 6.3.1 ROS regulované dráhy s rolí v hematopoeze

ROS také modulují molekuly, které mají důležité funkce v oblasti kmenových buněk, diferenciaci nebo reakci na stres, jako je HIF-1 $\alpha$ , p38 MAPK a TP53.

HIF-1 $\alpha$  je klíčovým transkripčním faktorem, důležitým pro adaptaci HSC v hypoxickém prostředí. Tento protein je stabilizován u HSC v klidovém stádiu (Takubo et al., 2010). Důležitou funkcí HIF-1 $\alpha$  je regulace glykolytické dráhy (Semenza et al., 1994), která je klíčovou součástí adaptace buněk v prostředí s nízkou koncentrací kyslíku a která může přispívat k nižší hladině ROS ve srovnání s buňkami využívajícími oxidativní metabolismus. U buněk s defektním HIF-1 $\alpha$  byla prokázána zvýšená hladina ROS, která způsobuje přemnožení těchto buněk a ztrátu kmenovosti. Příliš velká stabilizace HIF-1 $\alpha$  ale také vede k narušení správného fungování HSC, proto je důležitá přísná regulace udržování hladiny tohoto faktoru (Takubo et al., 2010). HIF-1 $\alpha$  také aktivuje wingless and int-1 (Wnt)/ $\beta$ -katenin signální dráhu, která je potřebná pro udržování HSC v klidovém stádiu (López-Ruano et al., 2015; Mazumdar et al., 2010). Wnt/ $\beta$ -katenin signální kaskáda je inhibovaná redoxní signalizací prostřednictvím nukleoredoxinu (Funato et al., 2006).

p38 MAPK je dalším důležitým proteinem regulovaným pomocí ROS, který ovlivňuje funkci HSC. Ito et al. v roce 2006 pozorovali zvýšenou hladinu ROS spolu se zvýšenou mírou fosforylace p38 MAPK v HSC s deletovaným ATM, což vedlo k narušení klidové fáze HSC. Tyto defektní účinky se podařilo zvrátit podáním inhibitoru p38 MAPK nebo antioxidantu (Ito et al., 2006). Ve studii z roku 2007 Miyamoto et al. zjistili, že HSC s deletovaným Foxo3a zároveň vykazují zvýšenou fosforylaci p38 MAPK, která je způsobená akumulací ROS. Aktivace této kaskády prostřednictvím zvýšené hladiny ROS tedy vede k narušení funkce sebeobnovy HSC.

Pro udržování HSC v klidovém stádiu je důležitý TP53 (Liu et al., 2009). Zároveň ale zvýšená hladina tohoto proteinu, pozorovaná v nepřítomnosti jeho inhibitoru mouse double minute 2 (Mdm2) a v přítomnosti oxidativního stresu, vede k akumulaci dalších ROS, což vyvolává zastavení buněčného cyklu HSC a jejich následné vyčerpání (H. A. Abbas et al., 2010). Z těchto studií vyplývá, že pro správné fungování HSC je důležitá rovnováha v hladině genu *p53* a jeho inhibitoru Mdm2.

## 7 Role redoxní homeostázy v leukemogenezi

Leukemogeneze je komplexní proces, který zahrnuje několik kroků, jejichž výsledná souhra vede k neomezené proliferaci a poruše diferenciaci krvetvorných buněk. Mnoho studií podporuje fakt, že ROS hrají důležitou roli v tomto procesu.

### 7.1 Extracelulární zdroje ROS a jejich role v leukemogenezi

Bylo ukázáno, že ROS mohou být iniciátory genetických změn vedoucích k leukemogenezi. Jedná se o případy sekundární produkce ROS v důsledku vnějších zdrojů jako např. expozice oxidačním látkám, jako je benzen nebo záření. Expozice benzenu vede ke zvýšení hladiny ROS, poškození DNA, aktivaci dráhy NF- $\kappa$ B a poruše tvorby erytroidních a myeloidních kolonií (Badham & Winn, 2010a). Působením SOD nebo katalázy jsou tyto dopady inhibovány (Badham & Winn, 2010b; Tung et al., 2012). ROS tedy hrají klíčovou roli v narušení signálních drah krvetvorných buněk při benzenem iniciované toxicitě (Badham & Winn, 2010a). Mezi další toxické látky, které poškozují HSC tím, že vyvolají oxidační stres, patří např. BDE 47. Expozice fetálních HSC BDE 47 způsobuje ztrátu životaschopnosti HSC, pokles mitochondriálního membránového potenciálu, zvýšení apoptózy a stimulovaný nárůst oxidačního stresu v důsledku zvýšené produkce ROS a peroxidace lipidů. Mitochondriální membránový potenciál a životaschopnost HSC lze obnovit předchozí inkubací HSC s NAC (Shao et al., 2008). Ionizující ozařování jako běžná metoda léčby leukémie vede ke zvýšené expresi několika receptorů a genů zapojených do regulace oxidačního stresu, včetně genů pro heme oxygenase 1 a NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (Monzen et al., 2011).

### 7.2 Intracelulární zdroje ROS v leukemických buňkách

Mezi intracelulární zdroje ROS v leukemických buňkách patří především mitochondriální dýchací řetězec. Leukemické buňky jsou závislé na mitochondriální produkci ATP, oxidativní fosforylaci (Lagadinou et al., 2013). Sriskanthadevan et al. měřili aktivitu citrát syntázy a počet kopií mitochondriální DNA (mtDNA). Přišli na to, že AML buňky vykazovaly větší mitochondriální hmotu oproti normálním HSC. Navíc v nich byla objevena zvýšená exprese faktorů pozitivně regulujících mitochondriální biogenezi. Tato zvětšená hmota mitochondrií ale nebyla doprovázena zvýšenou aktivitou respiračních komplexů I, III a IV nebo ATP syntázy, což znamená, že AML buňky obsahují menší rezervní kapacitu dýchacího řetězce než normální HSC. To vede k vyšší náchylnosti k oxidačnímu stresu (Sriskanthadevan et al., 2015). V leukemických buňkách byla také zpozorována vyšší frekvence výskytu mutací v mtDNA (He et al., 2003). Ta může být způsobena oxidačním

stresem, který vede k poškození DNA, jež mohou pozměnit expresi genů a vést k defektní oxidativní fosforylaci. Tyto alterace v mitochondriálním genomu mohou podporovat leukemogenezi (Kang et al., 2016).

Mezi další zdroje ROS v leukemických buňkách patří NOX, xantin oxidoreduktáza a další oxidázy zahrnuté v zánětlivých reakcích, jako jsou cyklooxygenázy a lipoxygenázy (Prieto-Bermejo et al., 2018). Zvýšená aktivita NOX2 enzymů byla nalezená u více než 60 % AML pacientů a vedla k akumulaci ROS u AML (Hole et al., 2013). NOX2 je všudypřítomně exprimován v blastických buňkách AML. V leukemických kmenových buňkách a v recidivující AML je jeho exprese snížena (Dakik et al., 2021).

Podobně jako je tomu u HSC, k regulaci hladiny ROS v leukemických buňkách přispívá mikroprostředí AML buněk a hraje roli v udržování jejich správné funkce. Zvýšená produkce ROS NOX enzymy vyvolává přenos mitochondrií stromálních buněk kostní dřeně do AML buněk prostřednictvím tunelovací nanotrubic (angl. tunneling nanotubes). Tyto mitochondrie jsou poté využívány AML buňkami (Marlein et al., 2017). Kooperace mezi AML a stromálními buňkami kostní dřeně za účelem podpory přežití a růstu AML buněk však probíhá různými mechanismy. Dalším příkladem je přenos acetátu ze stromálních buněk do AML buněk, který je v těchto buňkách využit v trikarboxylovém cyklu pro výrobu energie. Tento acetát je ve stromálních buňkách syntetizován z pyruvátu, což je stimulováno ROS, které byly přeneseny z AML buněk skrz gap junctions (Vilaplana-Lopera et al., 2021).

### 7.3 Mutace v genech vedoucí k akumulaci ROS v myeloidních leukemických buňkách

K narušení hladiny ROS dochází také v důsledku mutací v genech hrajících roli v leukemogenezi. Ty mohou způsobit navýšení produkce ROS prostřednictvím regulace různých signálních drah, které se účastní mechanismů kontroly hladiny ROS. *FLT3-ITD* mutace, běžně se vyskytující v AML, se projevují konstitutivní aktivací receptoru FLT3. Ten prostřednictvím fosforylace proteinů Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1) a STAT5 zvyšuje aktivitu NOX a následně produkci ROS (Sallmyr et al., 2008; Stanicka et al., 2015). Výsledná akumulace ROS vede ke dvouřetězcovým zlomům v DNA a jejich nepřesné a neefektivní opravě mechanismem „non-homologous end joining“. Tato poškození DNA mohou vést k zisku dalších mutací, hrajících roli v leukemogenezi a v rezistenci leukemických buněk na léky (Sallmyr et al., 2008). Dalším fúzním onkogenem, jehož exprese vyvolává produkci ROS v leukemických buňkách, je *BCR-ABL*. *BCR-ABL* onkogen produkuje onkogenní tyrosin kinázu (Sattler et al., 2000) a nachází se u většiny pacientů



s chronickou myeloidní leukémií (Rohrbacher et al., 2008). Produkce ROS v důsledku *BCR-ABL* exprese přispívá k maligní transformaci, buněčnému růstu, rezistenci k apoptóze a zvýšenému DNA poškození (Kim et al., 2005; Sattler et al., 2000). Podobně také MLL-AF9 fúzní onkogen reguluje hladinu ROS v leukemických buňkách. U leukemií s MLL-AF9 dochází k expresi MEIS1, který omezuje produkci ROS a zajišťuje tak jejich přežívání. Knockout *Meis1* v MLL-AF9 myším modelu vyvolal zřetelné zvýšení produkce ROS a apoptózu (Roychoudhury et al., 2015). Podobnou funkci má myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 4 (MLL4), jehož delece v MLL-AF9 způsobuje zvýšení kromě hladiny ROS také myeloidní diferenciaci leukemických blastů (Santos et al., 2014). Z těchto dat plyne, že *Meis1* i *MLL4* geny jsou nezbytné pro iniciaci MLL-fusion leukemií. Mutace v GTPase Ras také vede k její konstitutivní aktivaci. Hole et al., ukázali, že přítomnost mutací N-Ras nebo H-Ras v CD34<sup>+</sup> hematopoetických progenitorových buňkách vyvolala produkci ROS zprostředkovanou NOX. Navíc se ukázalo, že takto vzniklé ROS podporují proliferaci těchto buněk, a to nezávisle na růstových faktorech (Hole et al., 2010). Aydin et al. popsali zvýšenou produkci ROS enzymem NOX2 vyvolanou mutovanou K-Ras (Aydin et al., 2018). Mutace v genu kódujícím Janus kinase 2 (JAK2), konkrétně JAK2<sup>V617F</sup>, se běžně vyskytuje v MPN. Podněcuje produkci ROS, a to aktivací NOX (Hurtado-Nedelec et al., 2013) nebo snížením exprese katalázy prostřednictvím fosforylace Akt. Tato akumulace ROS vede k oxidativním poškozením DNA (Marty et al., 2013).

S výskytem mutací v leukemogenezi úzce souvisí přítomnost onkometabolitů, které také mohou podporovat produkci ROS. Jedním z nich je onkometabolit (D)-2HG, produkovaný mutovanými IDH1 a 2, který reverzibilně vyvolává leukemickou transformaci buněk. Zvýšená hladina (D)-2HG spolu s (D)-2HG-zprostředkovanou inhibicí TET2 blokuje diferenciaci TF-1 buněk (Losman et al., 2013). Ukázalo se, že (D)-2HG zvyšuje hladinu ROS v buňkách. ROS potom prostřednictvím ERK-dependentní dráhy zvyšují míru fosforylace NF- $\kappa$ B, čímž vyvolají navázání Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1 (PIN1). To vede k aktivaci genové exprese zprostředkované NF- $\kappa$ B. Geny kontrolované NF- $\kappa$ B dráhou zahrnují cytokiny, které posléze stimulují proliferaci buněk (J. Y. Chen et al., 2016). Dále bylo zjištěno, že (D)-2HG narušuje stabilizaci proteinu HIF-1 $\alpha$ , čímž ovlivňuje preferenci buněk pro metabolické dráhy, konkrétně přesměrovává metabolismus směrem k oxidativní fosforylaci (Böttcher et al., 2018). Tento onkometabolit navíc inhibuje lysine-specific demethylase 4A (KDM4A), která je součástí Jumonji domain 2 rodiny lysin demethyláz a prostřednictvím navázání DEP domain-obsahujícího mTOR-interagujícího proteinu inhibuje aktivitu mTORC1 a 2. Inhibice KDM4A tedy vede k aktivaci mTOR (Carbonneau et al., 2016). (D)-2HG působí jako onkometabolit, a to prostřednictvím ovlivnění několika různých procesů v buňkách. Mezi ně patří zvýšení proliferace a blokování diferenciaci, podpora akumulace ROS, aktivace mTOR signalizace a také přesměrování preference buňky k oxidativní fosforylaci.

## 7.4 Antioxidační systémy v leukemogenezi

Různé studie naznačují změnu v hladině antioxidačních systémů u leukemických buněk. Snížená aktivita těchto enzymů by mohla vést ke zvýšení oxidačního stresu a přispívat tímto způsobem k leukemogenezi. Rasool et al. popsali signifikantně sníženou hladinu SOD, katalázy, GPx a redukovaného glutathionu (Rasool et al., 2015). Studie Agrawal-Singh et al. naznačuje, že by snížení hladiny antioxidačních systémů mohlo být důsledkem epigenetického utišení genů. Přišli na to, že v AML buňkách docházelo ke snížení transkripce genu pro PRx2 (*PRDX2*), a to v důsledku snížené acetylace histonu 3 a hypermethylace promotoru tohoto genu. Ztráta transkripce *PRDX2* byla asociovaná s horší prognózou pacientů s AML (Agrawal-Singh et al., 2012).

Existují však případy, které ukazují naopak zvýšení aktivity antioxidačních systémů u buněk AML oproti normálním buňkám (Kato et al., 2003). V nedávné studii byla popsána zvýšená aktivita SOD v buňkách obsahujících IDH mutaci, ale snížená aktivita SOD v buňkách s mutací v DNMT3A. Hladina antioxidačních systémů by tedy mohla být ovlivněna i výskytem genetických mutací, které by mohly tímto způsobem mít vliv na proliferaci leukemických buněk (Mondet et al., 2019).

## 7.5 Adaptace buněk v leukemogenezi

Zvýšená produkce ROS vyvolává proliferaci AML buněk a vede k potlačení aktivity p38MAPK (Hole et al., 2013), která je v normálních buňkách naopak aktivovaná akumulací ROS a způsobuje ztrátu schopnosti sebeobnovy buněk (Ito et al., 2006). Aktivace p38MAPK funguje jako obrana proti proliferaci AML buněk vyvolané oxidačním stresem. Inhibice této odpovědi je tedy pravděpodobně jedna z adaptací leukemických buněk ke zvýšené hladině ROS a může docházet k selekci buněk vykazujících tuto inhibici (Hole et al., 2013). Zvýšená produkce ROS vede ke zvýšené míře aktivity glykolýzy, a to prostřednictvím vyvolání exprese uncoupling protein 2 a fosforylace adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), což vede ke zvýšení exprese klíčového enzymu pozitivně regulujícího glykolýzu, 6-fosfofrukto-2-kinázy/fruktóza-2,6-bisfosfatázy. Růst a přežití AML buněk se navíc ukázalo být závislé na aktivaci tohoto enzymu (Robinson et al., 2020).

V AML je běžná konstitutivní aktivace PI3K/Akt signalizace. Kharas et al. analyzovali buňky z transplantovaného myšího modelu kostní dřeně, do kterých vnesli myristoylovaný AKT1 (myr-AKT). Zjistili, že fosforylace proteinu AKT hraje roli v transformaci buněk. Po podání myr-AKT byla v příjemcích pozorována progresse do MPN nebo T-lymfomu a s nižším výskytem i transformace do AML (Kharas et al., 2010). AKT inhibuje FoxO transkripční faktory, které aktivují expresi několika antioxidačních genů, čímž konstitutivní aktivace proteinu AKT přispívá k oxidačnímu stresu v buňkách.

Pro AML buňky je typická zvýšená hladina ROS, která je důsledkem mutovaných genů, potlačení antioxidantních systémů nebo v důsledku jiných aktivit důležitých v transformaci buněk. Akumulované ROS mohou způsobovat poškození DNA, které vedou k dalším mutacím, nebo mohou ovlivňovat různé redoxní signální dráhy, a tím zvyšovat přežití a míru růstu buněk.

## 8 Závěr

Leukemogeneze je komplexní proces, který je výsledkem postupně nahromaděných mutací v HSC během života. Tyto mutace ovlivňují celou škálu biologických procesů jako je genová exprese, epigenetické mechanismy, signální dráhy klíčové pro přežití a proliferaci, ale také energetický a redoxní metabolismus. Mezi časté mutace v metabolických drahách, jejichž frekvence výskytu vzrůstá během leukemogeneze, jsou mutace v enzimech IDH1/2. Funkce mutovaných enzymů leží na křižovatce epigenetické regulace, metabolismu a redoxní homeostázy. V této práci byla představena role redoxních signalizačních drah důležitých v leukemogenezi. Úvodem byla popsána vybraná nádorová krevní onemocnění a nejčastější mutace, které hrají roli ve vzniku těchto onemocnění. Byly uvedeny mechanismy onkogenního působení mutovaných IDH 1/2 a jejich význam v ovlivnění epigenetických a metabolických procesů v leukemických buňkách, vliv na prognózu a vývoj léčiv cílených na IDH1/2. Byl zdůrazněn vliv mutovaných IDH1/2 na redoxní homeostázu. A to ať už deplecí NADPH, který je klíčovým redukčním činidlem nezbytným pro antioxidační obranu buňky, nebo inhibicí důležitých  $\alpha$ -KG-dependentních dioxygenáz.

Práce poukázala na důležitou roli ROS v buněčné signalizaci a v regulaci mnoha procesů v normální i maligní krevtvorbě. Pro zachování správné funkce těchto procesů musí být hladina ROS přísně regulována, což je zajištěno antioxidačním obranným systémem buňky. V práci byly popsány hlavní enzymy účastníci se této obrany. Pro leukemické buňky je typická zvýšená hladina ROS, jejichž intracelulární i extracelulární zdroje jsou v práci uvedeny. Akumulace těchto reaktivních látek hraje roli v adaptaci buněk na změny spojené s nádorovou transformací, a to prostřednictvím redoxní signalizace, která působí na různé signalizační kaskády a reguluje metabolické změny v buňkách. Mezi ně patří zvýšená proliferace a potlačená diferenciací buněk, rezistence k apoptóze nebo změny v preferenci energetického metabolismu. Tyto nově získané vlastnosti poskytují leukemickým buňkám výhody, vedoucí k jejich přežívání a ztrátě odpovědi na léčbu.

Na závěr bych tedy uvedla, že pro komplexní pochopení funkce mutovaných IDH1/2 je nezbytné porozumět jejich vlivu také na redoxní homeostázu pro vývoj a zlepšení účinnosti současných a případně i nových terapeutických přístupů k léčbě IDH-mutovaných leukemií. Tomuto aspektu IDH-mutovaných leukemií se budu věnovat ve své diplomové práci.

## 9 Seznam použité literatury

- Abbas, H. A., MacCio, D. R., Coskun, S., Jackson, J. G., Hazen, A. L., Sills, T. M., You, M. J., Hirschi, K. K., & Lozano, G. (2010). Mdm2 Is Required for Survival of Hematopoietic Stem Cells/Progenitors via Dampening of ROS-Induced p53 Activity. *Cell Stem Cell*, 7(5), 606–617. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2010.09.013>
- Abbas, S., Lugthart, S., Kavelaars, F. G., Schelen, A., Koenders, J. E., Zeilemaker, A., van Putten, W. J. L., Rijneveld, A. W., Löwenberg, B., & Valk, P. J. M. (2010). Acquired mutations in the genes encoding IDH1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: Prevalence and prognostic value. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 116(12), 2122–2126. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-250878>
- Abu-Duhier, F. M., Goodeve, A. C., Wilson, G. A., Gari, M. A., Peake, I. R., Rees, D. C., Vandenberghe, E. A., Winship, P. R., & Reilly, J. T. (2000). FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group. *British Journal of Haematology*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2000.02317.x>
- Achouri, Y., Noël, G., Vertommen, D., Rider, M. H., Veiga-Da-Cunha, M., & van Schaftingen, E. (2004). Identification of a dehydrogenase acting on D-2-hydroxyglutarate. In *Biochem. J* (Vol. 381). <https://doi.org/https://doi.org/10.1042/BJ20031933>
- \*Adès, L., Itzykson, R., & Fenaux, P. (2014). Myelodysplastic syndromes. *The Lancet*, 383(9936), 2239–2252. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61901-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61901-7)
- Agrawal-Singh, S., Isken, F., Agelopoulos, K., Klein, H. U., Thoennissen, N. H., Koehler, G., Hascher, A., Bäumer, N., Berdel, W. E., Thiede, C., Ehninger, G., Becker, A., Schlenke, P., Wang, Y., McClelland, M., Krug, U., Koschmieder, S., Büchner, T., Yu, D. Y., ... Müller-Tidow, C. (2012). Genome-wide analysis of histone H3 acetylation patterns in AML identifies PRDX2 as an epigenetically silenced tumor suppressor gene. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 119(10), 2346–2357. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2011-06-358705>
- Alexander, A., Cai, S. L., Kim, J., Nanez, A., Sahin, M., MacLean, K. H., Inoki, K., Guan, K. L., Shen, J., Person, M. D., Kusewitt, D., Mills, G. B., Kastan, M. B., & Walker, C. L. (2010). ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(9), 4153–4158. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.0913860107>
- \*Al-Khallaf, H. (2017). Isocitrate dehydrogenases in physiology and cancer: Biochemical and molecular insight. *Cell and Bioscience*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s13578-017-0165-3>
- Aydin, E., Hallner, A., Grauers Wiktorin, H., Staffas, A., Hellstrand, K., & Martner, A. (2018). NOX2 inhibition reduces oxidative stress and prolongs survival in murine KRAS-induced myeloproliferative disease. *Oncogene* 2018 38:9, 38(9), 1534–1543. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0528-1>
- Badham, H. J., & Winn, L. M. (2010a). In Utero Exposure to Benzene Disrupts Fetal Hematopoietic Progenitor Cell Growth via Reactive Oxygen Species. *Toxicological Sciences*, 113(1), 207–215. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFP242>
- Badham, H. J., & Winn, L. M. (2010b). In utero and in vitro effects of benzene and its metabolites on erythroid differentiation and the role of reactive oxygen species. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 244(3), 273–279. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2010.01.002>
- Barrett, W. C., DeGnore, J. P., Keng, Y. F., Zhang, Z. Y., Yim, M. B., & Chock, P. B. (1999). Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B. *Journal of Biological Chemistry*, 274(49), 34543–34546. <https://doi.org/10.1074/JBC.274.49.34543>
- Böttcher, M., Renner, K., Berger, R., Mentz, K., Thomas, S., Cardenas-Conejo, Z. E., Dettmer, K., Oefner, P. J., Mackensen, A., Kreutz, M., & Mougiakakos, D. (2018). D-2-hydroxyglutarate interferes with HIF-1 $\alpha$  stability skewing T-cell metabolism towards oxidative phosphorylation and

- impairing Th17 polarization. *OncoImmunology*, 7(7).  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1445454>
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., & Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell*, 96(6), 857–868. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80595-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80595-4)
- Cao, Y., Fang, Y., Cai, J., Li, X., Xu, F., Yuan, N., Zhang, S., & Wang, J. (2016). ROS functions as an upstream trigger for autophagy to drive hematopoietic stem cell differentiation. *Hematology*, 613–618. <https://doi.org/10.1080/10245332.2016.1165446>
- Carbonneau, M., Gagne, L. M., Lalonde, M. E., Germain, M. A., Motorina, A., Guiot, M. C., Secco, B., Vincent, E. E., Tumber, A., Hulea, L., Bergeman, J., Oppermann, U., Jones, R. G., Laplante, M., Topisirovic, I., Petrecca, K., Huot, M. É., & Mallette, F. A. (2016). The oncometabolite 2-hydroxyglutarate activates the mTOR signalling pathway. *Nature Communications 2016 7:1*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms12700>
- Chen, C., Liu, Y., Liu, R., Ikenoue, T., Guan, K. L., Liu, Y., & Zheng, P. (2008). TSC–mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(10), 2397. <https://doi.org/10.1084/JEM.20081297>
- Chen, J. Y., Lai, Y. S., Tsai, H. J., Kuo, C. C., Yen, B. L., Yeh, S. P., Sun, H. S., & Hung, W. C. (2016). The oncometabolite R-2-hydroxyglutarate activates NF-κB-dependent tumor-promoting stromal niche for acute myeloid leukemia cells. *Scientific Reports 2016 6:1*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep32428>
- Chen, Y. R., Chen, C. L., Pfeiffer, D. R., & Zweier, J. L. (2007). Mitochondrial complex II in the post-ischemic heart: Oxidative injury and the role of protein S-glutathionylation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(45), 32640–32654. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M702294200>
- Chowdhury, R., Yeoh, K. K., Tian, Y. M., Hillringhaus, L., Bagg, E. A., Rose, N. R., Leung, I. K. H., Li, X. S., Woon, E. C. Y., Yang, M., McDonough, M. A., King, O. N., Clifton, I. J., Klose, R. J., Claridge, T. D. W., Ratcliffe, P. J., Schofield, C. J., & Kawamura, A. (2011). The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases. *EMBO Reports*, 12(5), 463–469. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.43>
- \*Corces-Zimmerman, M. R., & Majeti, R. (2014). Pre-leukemic evolution of hematopoietic stem cells: the importance of early mutations in leukemogenesis. *Leukemia*, 28, 2276–2282. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.211>
- Crapo, J. D., Oury, T., Rabouille, C., Slot, J. W., & Chang, L. Y. (1992). Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(21), 10405–10409. <https://doi.org/10.1073/PNAS.89.21.10405>
- Dakik, H., Dor, M. el, Leclerc, J., Kouzi, F., Nehme, A., Deynoux, M., Debeissat, C., Khamis, G., Ducrocq, E., Ibrik, A., Stasia, M. J., Raad, H., Rezvani, H. R., Gouilleux, F., Zibara, K., Herault, O., & Mazurier, F. (2021). Characterization of NADPH Oxidase Expression and Activity in Acute Myeloid Leukemia Cell Lines: A Correlation with the Differentiation Status. *Antioxidants 2021, Vol. 10, Page 498, 10(3)*, 498. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10030498>
- Dang, L., White, D. W., Gross, S., Bennett, B. D., Bittinger, M. A., Driggers, E. M., Fantin, V. R., Jang, H. G., Jin, S., Keenan, M. C., Marks, K. M., Prins, R. M., Ward, P. S., Yen, K. E., Liao, L. M., Rabinowitz, J. D., Cantley, L. C., Thompson, C. B., vander Heiden, M. G., ... Su, M. (2009). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*, 462(7274), 739. <https://doi.org/10.1038/nature08617>
- Davies, K. J., & Goldberg, A. L. (1987). Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 262(17), 8220–8226. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)47552-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47552-7)
- Delhommeau, F., Dupont, S., Valle, V. della, James, C., Trannoy, S., Massé, A., Kosmider, O., le Couedic, J.-P., Robert, F., Alberdi, A., Lécluse, Y., Plo, I., Dreyfus, F. J., Marzac, C., Casadevall, N., Lacombe, C., Romana, S. P., Dessen, P., Soulier, J., ... Bernard, O. A. (2009). Mutation in

- TET2 in Myeloid Cancers. *New England Journal of Medicine*, 360(22), 2289–2301.  
[https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810069/SUPPL\\_FILE/NEJM\\_DELHOMMEAU\\_2289SA1.PDF](https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810069/SUPPL_FILE/NEJM_DELHOMMEAU_2289SA1.PDF)
- Deng, G., Shen, J., Yin, M., McManus, J., Mathieu, M., Gee, P., He, T., Shi, C., Bedel, O., McLean, L. R., Le-Strat, F., Zhang, Y., Marquette, J. P., Gao, Q., Zhang, B., Rak, A., Hoffmann, D., Rooney, E., Vassort, A., ... Licht, S. (2015). Selective inhibition of mutant isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) via disruption of a metal binding network by an allosteric small molecule. *Journal of Biological Chemistry*, 290(2), 762–774. <https://doi.org/10.1074/JBC.M114.608497>
- Deshpande, N. N., Sorescu, D., Seshiah, P., Ushio-Fukai, M., Akers, M., Yin, Q., & Griendling, K. K. (2002). Mechanism of hydrogen peroxide-induced cell cycle arrest in vascular smooth muscle. *Antioxidants and Redox Signaling*, 4(5), 845–854. <https://doi.org/10.1089/152308602760599007>
- DiNardo, C. D., Stein, A. S., Stein, E. M., Fathi, A. T., Frankfurt, O., Schuh, A. C., Döhner, H., Martinelli, G., Raffoux, E., Tan, P., Zeidan, A., Botton, S. de, Kantarjian, H. M., Stone, R. M., Lam, D., Wang, X., Gong, J., Kapsalis, S. M., Hickman, D., ... Vyas, P. (2019). Mutant IDH1 Inhibitor Ivosidenib (IVO; AG-120) in Combination with Azacitidine (AZA) for Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia (ND AML). *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, 19, S217–S218. <https://doi.org/10.1016/J.CLML.2019.07.090>
- Essers, M. A. G., Weijzen, S., de Vries-Smits, A. M. M., Saarloos, I., de Ruiter, N. D., Bos, J. L., & Burgering, B. M. T. (2004). FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *The EMBO Journal*, 23(24), 4802–4812. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7600476>
- \*Estey, E., & Döhner, H. (2006). Acute myeloid leukaemia. *The Lancet*, 368, 1894–1907. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69780-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69780-8)
- Figueroa, M. E., Abdel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P. S., Patel, J., Shih, A., Li, Y., Bhagwat, N., Vasanthakumar, A., Fernandez, H. F., Tallman, M. S., Sun, Z., Wolniak, K., Peeters, J. K., Liu, W., Choe, S. E., Fantin, V. R., Paietta, E., Löwenberg, B., ... Melnick, A. (2010). Leukemic IDH1 and IDH2 Mutations Result in a Hypermethylation Phenotype, Disrupt TET2 Function, and Impair Hematopoietic Differentiation. *Cancer Cell*, 18(6), 553–567. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2010.11.015>
- Fligiel, S. E. G., Lee, E. C., McCoy, J. P., Johnson, K. J., & Varani, J. (1984). Protein degradation following treatment with hydrogen peroxide. *The American Journal of Pathology*, 115(3), 418. [/pmc/articles/PMC1900517/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1900517/?report=abstract)
- Funato, Y., Michiue, T., Asashima, M., & Miki, H. (2006). The thioredoxin-related redox-regulating protein nucleoredoxin inhibits Wnt-β-catenin signalling through Dishevelled. *Nature Cell Biology* 2006 8:5, 8(5), 501–508. <https://doi.org/10.1038/ncb1405>
- Gabriel, J. L., Milner, R., & Plaut', G. W. E. (1985). Inhibition and Activation of Bovine Heart NAD-Specific Isocitrate Dehydrogenase by ATP'. In *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS* (Vol. 240, Issue 1). [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-9861\(85\)90015-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-9861(85)90015-3)
- Gelman, S. J., Naser, F., Mahieu, N. G., McKenzie, L. D., Dunn, G. P., Chheda, M. G., & Patti, G. J. (2018). Consumption of NADPH for 2-HG Synthesis Increases Pentose Phosphate Pathway Flux and Sensitizes Cells to Oxidative Stress. *Cell Reports*, 22(2), 512–522. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.050>
- \*Gilliland, D. G., & Griffin, J. D. (2002). The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 100. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-02-0492>
- Green, A., & Beer, P. (2010). Somatic Mutations of IDH1 and IDH2 in the Leukemic Transformation of Myeloproliferative Neoplasms. *New England Journal of Medicine*, 362(4), 369–370. <https://doi.org/10.1056/NEJMc0910063>
- Green, C. L., Evans, C. M., Zhao, L., Hills, R. K., Burnett, A. K., Linch, D. C., & Gale, R. E. (2011). The prognostic significance of IDH2 mutations in AML depends on the location of the mutation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 409–412. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-322479>
- \*Groitl, B., & Jakob, U. (2014). Thiol-based redox switches. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Proteins and Proteomics*, 1335–1343. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.03.007>

- Guo, Z., Kozlov, S., Lavin, M. F., Person, M. D., & Paull, T. T. (2010). ATM activation by oxidative stress. *Science*, 330(6003), 517–521. <https://doi.org/10.1126/science.1192912>
- He, I., Luo, L., Proctor, S. J., Middleton, P. G., Blakely, E. L., Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2003). Somatic mitochondrial DNA mutations in adult-onset leukaemia. *Leukemia* 2003 17:12, 17(12), 2487–2491. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403146>
- Hermitte, F., Brunet de la Grange, P., Belloc, F., Praloran, V., & Ivanovic, Z. (2006). Very low O<sub>2</sub> concentration (0.1%) favors G<sub>0</sub> return of dividing CD34<sup>+</sup> cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 24(1), 65–73. <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.2004-0351>
- Hole, P. S., Pearn, L., Tonks, A. J., James, P. E., Burnett, A. K., Darley, R. L., & Tonks, A. (2010). Ras-induced reactive oxygen species promote growth factor-independent proliferation in human CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 115(6), 1238–1246. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2009-06-222869>
- Hole, P. S., Zabkiewicz, J., Munje, C., Newton, Z., Pearn, L., White, P., Marquez, N., Hills, R. K., Burnett, A. K., Tonks, A., & Darley, R. L. (2013). Overproduction of NOX-derived ROS in AML promotes proliferation and is associated with defective oxidative stress signaling. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 122(19), 3322–3330. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2013-04-491944>
- \*Hope, K. J., Jin, L., & Dick, J. E. (2003). Human acute myeloid leukemia stem cells. *Archives of Medical Research*, 34(6), 507–514. <https://doi.org/10.1016/J.ARCMED.2003.08.007>
- Huang, W. C., Chio, C. C., Chi, K. H., Wu, H. M., & Lin, W. W. (2002). Superoxide anion-dependent Raf/MEK/ERK activation by peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  agonists 15-deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J<sub>2</sub>, ciglitazone, and GW1929. *Experimental Cell Research*, 277(2), 192–200. <https://doi.org/10.1006/EXCR.2002.5546>
- Hurtado-Nedelec, M., Csillag, M. J. G., Boussetta, T., Belambri, S. A., Fay, M., Cassinat, B., Gougerot, M. A. P., Dang, P. M. C., & El-Benna, J. (2013). Increased reactive oxygen species production and p47phox phosphorylation in neutrophils from myeloproliferative disorders patients with JAK2 (V617F) mutation. *Haematologica*, 98(10), 1517. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2012.082560>
- Hyun, A. W., Jeong, W., Chang, T. S., Kwang, J. P., Sung, J. P., Jeong, S. Y., & Sue, G. R. (2005). Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-Cys peroxiredoxins. *Journal of Biological Chemistry*, 280(5), 3125–3128. <https://doi.org/10.1074/JBC.C400496200>
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., & Guan, K. L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature Cell Biology*, 4(9), 648–657. <https://doi.org/10.1038/NCB839>
- Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Matsuoka, S., Takubo, K., Hamaguchi, I., Nomiyama, K., Hosokawa, K., Sakurada, K., Nakagata, N., Ikeda, Y., Mak, T. W., & Suda, T. (2004). Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 997–1002. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nature02989>
- Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Takubo, K., Matsuoka, S., Miyamoto, K., Ohmura, M., Naka, K., Hosokawa, K., Ikeda, Y., & Suda, T. (2006). Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nature Medicine* 2006 12:4, 12(4), 446–451. <https://doi.org/10.1038/nm1388>
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., & Nabeshima, Y. (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236(2), 313–322. <https://doi.org/10.1006/BBRC.1997.6943>
- Jang, Y. Y., & Sharkis, S. J. (2007). A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 110(8), 3056. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2007-05-087759>
- Jiang, B., Liu, J. H., Bao, Y. M., & An, L. J. (2003). Hydrogen peroxide-induced apoptosis in pc12 cells and the protective effect of puerarin. *Cell Biology International*, 27(12), 1025–1031. <https://doi.org/10.1016/J.CELLBI.2003.09.007>



- Jung, C.-H., & Thomas, J. A. (1996). S-Glutathiolated Hepatocyte Proteins and Insulin Disulfides as Substrates for Reduction by Glutaredoxin, Thioredoxin, Protein Disulfide Isomerase, and Glutathione 1. In *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS* (Vol. 335, Issue 1). <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0482>
- Kang, M. G., Kim, Y. N., Lee, J. H., Szardenings, M., Baek, H. J., Kook, H., Kim, H. R., & Shin, M. G. (2016). Clinicopathological Implications of Mitochondrial Genome Alterations in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *Annals of Laboratory Medicine*, *36*(2), 101. <https://doi.org/10.3343/ALM.2016.36.2.101>
- Karnati, S., Lüers, G., Pfreimer, S., & Baumgart-Vogt, E. (2013). Mammalian SOD2 is exclusively located in mitochondria and not present in peroxisomes. *Histochemistry and Cell Biology*, *140*(2), 105–117. <https://doi.org/10.1007/S00418-013-1099-4/TABLES/3>
- Kato, M., Minakami, H., Kuroiwa, M., Kobayashi, Y., Oshima, S., Kozawa, K., Morikawa, A., & Kimura, H. (2003). Superoxide radical generation and Mn- and Cu-Zn superoxide dismutases activities in human leukemic cells. *Hematological Oncology*, *21*(1), 11–16. <https://doi.org/10.1002/HON.699>
- Kharas, M. G., Okabe, R., Ganis, J. J., Gozo, M., Khandan, T., Paktinat, M., Gilliland, D. G., & Gritsman, K. (2010). Constitutively active AKT depletes hematopoietic stem cells and induces leukemia in mice. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *115*(7), 1406–1415. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2009-06-229443>
- Kihara, R., Nagata, Y., Kiyoi, H., Kato, T., Yamamoto, E., Suzuki, K., Chen, F., Asou, N., Ohtake, S., Miyawaki, S., Miyazaki, Y., Sakura, T., Ozawa, Y., Usui, N., & Kanamori, H. (2014). Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients. *Leukemia*, *17*, 1586–1595. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.55>
- Kim, J. H., Chu, S. C., Gramlich, J. L., Pride, Y. B., Babendreier, E., Chauhan, D., Salgia, R., Podar, K., Griffin, J. D., & Sattler, M. (2005). Activation of the PI3K/mTOR pathway by BCR-ABL contributes to increased production of reactive oxygen species. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *105*(4), 1717–1723. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2004-03-0849>
- Kops, G. J. P. L., Dansen, T. B., Polderman, P. E., Saarloos, I., Wirtz, K. W. A., Coffey, P. J., Huang, T. T., Bos, J. L., Medema, R. H., & Burgering, B. M. T. (2002). Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* *2002* *419*:6904, *419*(6904), 316–321. <https://doi.org/10.1038/nature01036>
- Kosmider, O., Gelsi-Boyer, V., Cheok, M., Grabar, S., Della-Valle, V., Picard, F., Vigié, F., Quesnel, B., Beyne-Rauzy, O., Solary, E., Vey, N., Hunault-Berger, M., Fenaux, P., Mansat-De Mas, V., Delabesse, E., Guardiola, P., Lacombe, C., Vainchenker, W., Preudhomme, C., ... Fontenay, M. (2009). TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs). *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *114*(15), 3285–3291. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2009-04-215814>
- Kosmider, O., Gelsi-Boyer, V., Slama, L., Dreyfus, F., Beyne-Rauzy, O., Quesnel, B., Hunault-Berger, M., Slama, B., Vey, N., Lacombe, C., Solary, E., Birnbaum, D., Bernard, O. A., & Fontenay, M. (2010). Mutations of IDH1 and IDH2 genes in early and accelerated phases of myelodysplastic syndromes and MDS/myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*, 1094–1096. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.52>
- Kubota, Y., Takubo, K., & Suda, T. (2008). Bone marrow long label-retaining cells reside in the sinusoidal hypoxic niche. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *366*(2), 335–339. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2007.11.086>
- Lagadinou, E. D., Sach, A., Callahan, K., Rossi, R. M., Neering, S. J., Minhajuddin, M., Ashton, J. M., Pei, S., Grose, V., O'Dwyer, K. M., Liesveld, J. L., Brookes, P. S., Becker, M. W., & Jordan, C. T. (2013). BCL-2 Inhibition Targets Oxidative Phosphorylation and Selectively Eradicates Quiescent Human Leukemia Stem Cells. *Cell Stem Cell*, *12*(3), 329–341. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2012.12.013>
- Lee, S. R., Yang, K. S., Kwon, J., Lee, C., Jeong, W., & Rhee, S. G. (2002). Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(23), 20336–20342. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111899200>

- Ley, T. J., Ding, L., Walter, M. J., McLellan, M. D., Lamprecht, T., Larson, D. E., Kandath, C., Payton, J. E., Baty, J., Welch, J., Harris, C. C., Lichti, C. F., Townsend, R. R., Fulton, R. S., Dooling, D. J., Koboldt, D. C., Schmidt, H., Zhang, Q., Osborne, J. R., ... Wilson, R. K. (2010). DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 363(25), 2424. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1005143>
- Li, M., Zhao, L., Liu, J., Liu, A. L., Zeng, W. sen, Luo, S. Q., & Bai, X. C. (2009). Hydrogen Peroxide Induces G2 Cell Cycle Arrest and Inhibits Cell Proliferation in Osteoblasts. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 292(8), 1107–1113. <https://doi.org/10.1002/AR.20925>
- Lindsley, R. C., Mar, B. G., Mazzola, E., Grauman, P. v, Shareef, S., Allen, S. L., Pigneux, A., Wetzler, M., Stuart, R. K., Erba, H. P., Damon, L. E., Powell, B. L., Lindeman, N., Steensma, D. P., Wadleigh, M., Deangelo, D. J., Neuberg, D., Stone, R. M., & Ebert, B. L. (2015). Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations Key Points. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 1367–1376. <https://doi.org/10.1182/blood>
- \*Liou, G.-Y., & Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. *FreeRadical Research*. <https://doi.org/10.3109/10715761003667554>
- Little, C., & O'brien, P. J. (1969). Mechanism of Peroxide-Inactivation of the Sulphydryl Enzyme Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase. In *European J. Biochem* (Vol. 0). <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1969.tb00721.x>
- Liu, Y., Elf, S. E., Miyata, Y., Sashida, G., Liu, Y., Huang, G., di Giandomenico, S., Lee, J. M., Deblasio, A., Menendez, S., Antipin, J., Reva, B., Koff, A., & Nimer, S. D. (2009). p53 Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence. *Cell Stem Cell*, 4(1), 37–48. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2008.11.006>
- López-Ruano, G., Prieto-Bermejo, R., Ramos, T. L., San-Segundo, L., Sánchez-Abarca, L. I., Sánchez-Guijo, F., Pérez-Simón, J. A., Sánchez-Yagüe, J., Llanillo, M., & Hernández-Hernández, Á. (2015). PTPN13 and  $\beta$ -Catenin Regulate the Quiescence of Hematopoietic Stem Cells and Their Interaction with the Bone Marrow Niche. *Stem Cell Reports*, 5(4), 516. <https://doi.org/10.1016/J.STEMCR.2015.08.003>
- Losman, J. A., Looper, R. E., Koivunen, P., Lee, S., Schneider, R. K., McMahon, C., Cowley, G. S., Root, D. E., Ebert, B. L., & Kaelin, W. G. (2013). (R)-2-hydroxyglutarate is sufficient to promote leukemogenesis and its effects are reversible. *Science*, 340(6127), 1621–1625. <https://doi.org/10.1126/science.1231677>
- Lu, C., Ward, P. S., Kapoor, G. S., Rohle, D., Turcan, S., Abdel-Wahab, O., Edwards, C. R., Khanin, R., Figueroa, M. E., Melnick, A., Wellen, K. E., O'rourke, D. M., Berger, S. L., Chan, T. A., Levine, R. L., Mellinghoff, I. K., & Thompson, C. B. (2012). IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature*, 483. <https://doi.org/10.1038/nature10860>
- Ma, X., Does, M., Raza, A., & Mayne, S. T. (2007). Myelodysplastic syndromes. *Cancer*, 109(8), 1536–1542. <https://doi.org/10.1002/CNCR.22570>
- MacBeth, K. J., Chopra, V. S., Tang, L., Zheng, B., Avanzino, B., See, W. L., Schwickart, M., Figueroa, M. E., Quek, L., & DiMartino, J. F. (2021). Combination of azacitidine and enasidenib enhances leukemic cell differentiation and cooperatively hypomethylates DNA. *Experimental Hematology*, 98, 47-52.e6. <https://doi.org/10.1016/J.EXPHEM.2021.03.003>
- \*Magnani, F., & Mattevi, A. (2019). Structure and mechanisms of ROS generation by NADPH oxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, 59, 91–97. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2019.03.001>
- Manning, B. D., Tee, A. R., Logsdon, M. N., Blenis, J., & Cantley, L. C. (2002). Identification of the Tuberous Sclerosis Complex-2 Tumor Suppressor Gene Product Tuberin as a Target of the Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Pathway. *Molecular Cell*, 10(1), 151–162. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00568-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00568-3)
- Mardis, E. R., Ding, L., Dooling, D. J., Larson, D. E., McLellan, M. D., Chen, K., Koboldt, D. C., Fulton, R. S., Delehaunty, K. D., McGrath, S. D., Fulton, L. A., Locke, D. P., Magrini, V. J., Abbott, R. M., Vickery, T. L., Reed, J. S., Robinson, J. S., Wylie, T., Smith, S. M., ... Cancer Center, S. P. (2009). *Recurring Mutations Found by Sequencing an Acute Myeloid Leukemia Genome*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0903840>

- \*Marinho, H. S., Real, C., Cyrne, L., Soares, H., & Antunes, F. (2014). Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biology*, 2(1), 535–562. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2014.02.006>
- Marklund, S. L., Holme, E., & Hellner, L. (1982). Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clinica Chimica Acta*, 126(1), 41–51. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(82\)90360-6](https://doi.org/10.1016/0009-8981(82)90360-6)
- Marlein, C. R., Zaitseva, L., Piddock, R. E., Robinson, S. D., Edwards, D. R., Shafat, M. S., Zhou, Z., Lawes, M., Bowles, K. M., & Rushworth, S. A. (2017). NADPH oxidase-2 derived superoxide drives mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to leukemic blasts. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 130(14), 1649–1660. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2017-03-772939>
- Marty, C., Lacout, C., Droin, N., le Couédic, J. P., Ribrag, V., Solary, E., Vainchenker, W., Villeval, J. L., & Plo, I. (2013). A role for reactive oxygen species in JAK2V617F myeloproliferative neoplasm progression. *Leukemia* 2013 27:11, 27(11), 2187–2195. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.102>
- Maryanovich, M., Zaltsman, Y., Ruggiero, A., Goldman, A., Shachnai, L., Zaidman, S. L., Porat, Z., Golan, K., Lapidot, T., & Gross, A. (2015). An MTCH2 pathway repressing mitochondria metabolism regulates haematopoietic stem cell fate. *Nature Communications* 2015 6:1, 6(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms8901>
- Mazumdar, J., O'Brien, W. T., Johnson, R. S., Lamanna, J. C., Chavez, J. C., Klein, P. S., & Simon, M. C. (2010). O<sub>2</sub> regulates stem cells through Wnt/β-catenin signalling. *Nature Cell Biology*, 12(10), 1007. <https://doi.org/10.1038/NCB2102>
- \*Meshinchi, S., & Appelbaum, F. R. (2009). Structural and Functional Alterations of FLT3 in Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1123>
- \*Mieyal, J. J., Gallogly, M. M., Qanungo, S., Sabens, E. A., & Shelton, M. D. (2008). Molecular Mechanisms and Clinical Implications of Reversible Protein S-Glutathionylation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(11), 1941. <https://doi.org/10.1089/ARS.2008.2089>
- Mieyal, J. J., & Gravina, S. A. (1993). Thioltransferase Is a Specific Glutathionyl Mixed Disulfide Oxidoreductase. *Biochemistry*, 32(13), 3368–3376. <https://doi.org/10.1021/BI00064A021>
- Miyamoto, K., Araki, K. Y., Naka, K., Arai, F., Takubo, K., Yamazaki, S., Matsuoka, S., Miyamoto, T., Ito, K., Ohmura, M., Chen, C., Hosokawa, K., Nakauchi, H., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Harada, M., Motoyama, N., Suda, T., & Hirao, A. (2007). Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell*, 1(1), 101–112. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2007.02.001>
- Mondet, J., Presti, C. lo, Garrel, C., Skaare, K., Mariette, C., Carras, S., Park, S., Carré, M., Bulabois, C. E., Molina, L., Gressin, R., Thiebaut, A., Courby, S., Socoro-Yuste, N., Faure, P., Leer-Florin, A. M., Cahn, J. Y., & Mossuz, P. (2019). Adult patients with de novo acute myeloid leukemia show a functional deregulation of redox balance at diagnosis which is correlated with molecular subtypes and overall survival. *Haematologica*, 104(9), e393. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2018.206821>
- Monzen, S., Tashiro, E., & Kashiwakura, I. (2011). Megakaryocytopoiesis and Thrombopoiesis in Hematopoietic Stem Cells Exposed to Ionizing Radiation. *Radiation Research*, 176(6), 716–724. <https://doi.org/10.1667/RR2725.1>
- Mugoni, V., Panella, R., Cheloni, G., Chen, M., Pozdnyakova, O., Stroopinsky, D., Guarnerio, J., Monteleone, E., Lee, J. D., Mendez, L., Menon, A. V., Aster, J. C., Lane, A. A., Stone, R. M., Galinsky, I., Zamora, J. C., Lo-Coco, F., Kumar Bhasin, M., Avigan, D., ... Pandolfi, P. P. (2019). Vulnerabilities in mIDH2 AML confer sensitivity to APL-like targeted combination therapy. *Cell Research*, 446–459. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0162-7>
- Murakami, S., Suzuki, T., Harigae, H., Romeo, P.-H., Yamamoto, M., & Motohashi, H. (2017). NRF2 Activation Impairs Quiescence and Bone Marrow Reconstitution Capacity of Hematopoietic Stem Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 37(19). <https://doi.org/10.1128/MCB.00086-17>
- Myrset, A. H., Bostad, A., Jamin, N., Lirsac, P. N., Toma, F., & Gabrielsen, O. S. (1993). DNA and redox state induced conformational changes in the DNA-binding domain of the Myb oncoprotein. *EMBO Journal*, 12(12), 4625–4633. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1993.TB06151.X>

- Nakamura, N. (1983). A Stable Sulfenic Acid, 9-Triptycenesulfenic Acid: Its Isolation and Characterization. *Journal of the American Chemical Society*, 105(24), 7172–7173. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ja00362a026>
- National Cancer Institute. (2022). SEER Cancer Stat Facts: Acute Myeloid Leukemia. Accessed: 29.4.2022. <https://Seer.Cancer.Gov/Statfacts/Html/Amyl.Html>.
- Niles, J. C., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (2006). Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: Structures and mechanisms of product formation. *Nitric Oxide*, 14, 109–121. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2005.11.001>
- \*Orkin, S. H., & Zon, L. I. (2008). Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell*, 132(4), 631–644. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2008.01.025>
- Pal, B. C., Uziel, M., Doherty, D. G., & Cohn, W. E. (1969). Isolation and Characterization of a Pyrimidine Sulfenic Acid via Scission of the Sulfur-Sulfur Bond in the Methyl Analog of Bis(4-thiouridine) Disulfide. *Journal of the American Chemical Society*, 91(13), 3634–3638. <https://doi.org/10.1021/JA01041A036>
- Park, J. W., Mieyal, J. J., Rhee, S. G., & Chock, P. B. (2009). Deglutathionylation of 2-Cys Peroxiredoxin Is Specifically Catalyzed by Sulfiredoxin. *Journal of Biological Chemistry*, 284(35), 23364–23374. <https://doi.org/10.1074/JBC.M109.021394>
- Paschka, P., Schlenk, R. F., Gaidzik, V. I., Haddad, M., Krönke, J., Bullinger, L., Späth, D., Kayser, S., Zucknick, M., Götze, K., Horst, H. A., Germing, U., Döhner, H., & Döhner, K. (2010). IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. *Journal of Clinical Oncology*, 28(22), 3636–3643. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.28.3762>
- Patel, J. P., Gönen, M., Figueroa, M. E., Fernandez, H., Sun, Z., Racevskis, J., van Vlierberghe, P., Dolgalev, I., Thomas, S., Aminova, O., Huberman, K., Cheng, J., Viale, A., Socci, N. D., Heguy, A., Cherry, A., Vance, G., Higgins, R. R., Ketterling, R. P., ... Levine, R. L. (2012). Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*, 366(22), 1079–1089. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1112304>
- Paul, M. K., Bisht, B., Darmawan, D. O., Chiou, R., Ha, V. L., Wallace, W. D., Chon, A. T., Hegab, A. E., Grogan, T., Elashoff, D. A., Alva-Ornelas, J. A., & Gomperts, B. N. (2014). Dynamic Changes in Intracellular ROS Levels Regulate Airway Basal Stem Cell Homeostasis through Nrf2-Dependent Notch Signaling. *Cell Stem Cell*, 15(2), 199–214. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2014.05.009>
- \*Paulsen, C. E., & Carroll, K. S. (2013). Cysteine-mediated redox signaling: Chemistry, biology, and tools for discovery. In *Chemical Reviews* (Vol. 113, Issue 7, pp. 4633–4679). <https://doi.org/10.1021/cr300163e>
- PDQ® Adult Treatment Editorial Board. (2021). *PDQ Myelodysplastic Syndromes Treatment*. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Accessed 29.4.2022. <https://www.cancer.gov/types/myeloproliferative/hp/myelodysplastic-treatment-pdq>.
- PDQ® Adult Treatment Editorial Board. (2022). *PDQ Acute Myeloid Leukemia Treatment*. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Accessed 29.4.2022. <https://www.cancer.gov/types/leukemia/hp/adult-aml-treatment-pdq>.
- Peltoniemi, M. J., Karala, A. R., Jurvansuu, J. K., Kinnula, V. L., & Ruddock, L. W. (2006). Insights into deglutathionylation reactions: Different intermediates in the glutaredoxin and protein disulfide isomerase catalyzed reactions are defined by the  $\gamma$ -linkage present in glutathione. *Journal of Biological Chemistry*, 281(44), 33107–33114. <https://doi.org/10.1074/JBC.M605602200>
- Piccoli, C., D'Aprile, A., Ripoli, M., Scrima, R., Lecce, L., Boffoli, D., Tabilio, A., & Capitanio, N. (2007). Bone-marrow derived hematopoietic stem/progenitor cells express multiple isoforms of NADPH oxidase and produce constitutively reactive oxygen species. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 353(4), 965–972. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2006.12.148>
- Piccoli, C., Ria, R., Scrima, R., Cela, O., D'Aprile, A., Boffoli, D., Falzetti, F., Tabilio, A., & Capitanio, N. (2005). Characterization of Mitochondrial and Extra-mitochondrial Oxygen Consuming Reactions in Human Hematopoietic Stem Cells: NOVEL EVIDENCE OF THE OCCURRENCE

- OF NAD(P)H OXIDASE ACTIVITY. *Journal of Biological Chemistry*, 280(28), 26467–26476. <https://doi.org/10.1074/JBC.M500047200>
- Popovici-Muller, J., Reném, V, Lemieux, R., Artin, E., Saunders, J. O., Salituro, F. G., Travins, J., Cianchetta, G., Cai, Z., Zhou, D., Cui, D., Chen, P., Straley, K., Tobin, E., Wang, F., David, M. D., Penard-Lacronique, V., Quivoron, C., Véronique, V., ... Yen, K. (2018). Discovery of AG-120 (Ivosidenib): A First-in-Class Mutant IDH1 Inhibitor for the Treatment of IDH1 Mutant Cancers. *CS Medicinal Chemistry Letters*, 300–305. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.7b00421>
- \*Prieto-Bermejo, R., Romo-González, M., Pérez-Fernández, A., Ijurko, C., & Hernández-Hernández, Á. (2018). Reactive oxygen species in haematopoiesis: Leukaemic cells take a walk on the wild side. In *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* (Vol. 37, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0797-0>
- Rasool, M., Farooq, S., Malik, A., Shaukat, A., Manan, A., Asif, M., Sani, S., Qazi, M. H., Kamal, M. A., Iqbal, Z., & Hussain, A. (2015). Assessment of circulating biochemical markers and antioxidative status in acute lymphoblastic leukemia (ALL) and acute myeloid leukemia (AML) patients. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(1), 106. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2014.09.002>
- Rehder, D. S., & Borges, C. R. (2010). Cysteine sulfenic Acid as an Intermediate in Disulfide Bond Formation and Nonenzymatic Protein Folding. *Biochemistry*, 49, 7748–7755. <https://doi.org/10.1021/bi1008694>
- Renaud, L., Nibourel, O., Berthon, C., Roumier, C., Rodriguez, C., Frimat, C., Roche-Lestienne, C., Renneville, A., Quesnel, B., & Preudhomme, C. (2016). *De Novo and Secondary Acute Myeloid Leukemia, Real World Data on Outcomes from the French Nord-Pas-De-Calais Picardie Acute Myeloid Leukemia Observatory*. <https://doi.org/10.1182/blood.V128.22.4013.4013>
- Robinson, A. J., Hopkins, G. L., Rastogi, N., Hodges, M., Doyle, M., Davies, S., Hole, P. S., Omidvar, N., Darley, R. L., & Tonks, A. (2020). Reactive oxygen species drive proliferation in acute myeloid leukemia via the glycolytic regulator PFKFB3. *Cancer Research*, 80(5), 937–949. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-1920/653872/AM/REACTIVE-OXYGEN-SPECIES-DRIVE-PROLIFERATION-IN>
- Rohrbacher, M., Berger, U., Hochhaus, A., Metzgeroth, G., Adam, K., Lahaye, T., Saussele, S., Müller, M. C., Hasford, J., Heimpel, H., & Hehlmann, R. (2008). Clinical trials underestimate the age of chronic myeloid leukemia (CML) patients. Incidence and median age of Ph/BCR-ABL-positive CML and other chronic myeloproliferative disorders in a representative area in Germany. *Leukemia* 2009 23:3, 23(3), 602–604. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.245>
- Rombouts, W. J. C., Blokland, I., Löwenberg, B., & Ploemacher, R. (2000). Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the Flt3 gene. *Leukemia* 2000 14:4, 14(4), 675–683. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401731>
- Roychoudhury, J., Clark, J. P., Gracia-Maldonado, G., Unnisa, Z., Wunderlich, M., Link, K. A., Dasgupta, N., Aronow, B., Huang, G., Mulloy, J. C., & Kumar, A. R. (2015). MEIS1 regulates an HLF–oxidative stress axis in MLL-fusion gene leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 125(16), 2544–2552. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2014-09-599258>
- Rubbsi, H., & dig, R., Tryiilloq, M., Teneri\$, R., Kalyanaramann, B., Barnesll, S., Kirk, M., & Freeman, B. A. (1994). Nitric Oxide Regulation of Superoxide and Peroxynitrite-dependent Lipid Peroxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 269(42), 26066–26075. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)47160-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47160-8)
- \*Rubnitz, J. E., Gibson, B., & Smith, F. O. (2010). Acute Myeloid Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 24(1), 35–63. <https://doi.org/10.1016/J.HOC.2009.11.008>
- \*Rydström, J. (2006). Mitochondrial NADPH, transhydrogenase and disease. In *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* (Vol. 1757, Issues 5–6, pp. 721–726). <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.03.010>
- Salgo, M. G., Bermudez, E., Squadrito, G. L., & Pryor, W. A. (1995). DNA Damage and Oxidation of Thiols Peroxynitrite Causes in Rat Thymocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 322(2), 500–505. <https://doi.org/10.1006/ABBI.1995.1493>

- Sallmyr, A., Fan, J., Datta, K., Kim, K. T., Grosu, D., Shapiro, P., Small, D., & Rassool, F. (2008). Internal tandem duplication of FLT3 (FLT3/ITD) induces increased ROS production, DNA damage, and misrepair: implications for poor prognosis in AML. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *111*(6), 3173–3182. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2007-05-092510>
- Santos, M. A., Faryabi, R. B., Ergen, A. v., Day, A. M., Malhowski, A., Canela, A., Onozawa, M., Lee, J. E., Callen, E., Gutierrez-Martinez, P., Chen, H. T., Wong, N., Finkel, N., Deshpande, A., Sharrow, S., Rossi, D. J., Ito, K., Ge, K., Aplan, P. D., ... Nussenzweig, A. (2014). DNA-damage-induced differentiation of leukaemic cells as an anti-cancer barrier. *Nature* *2014* *514*:7520, *514*(7520), 107–111. <https://doi.org/10.1038/nature13483>
- Sara Zarnegar-Lumley, M., Todd A. Alonzo, P., Megan Othus, P., Zhuoxin Sun, P., Rhonda E. Ries, M., Yi-Cheng Wang, M., Amanda R. Leonti, M., Matthew A. Kutny, M., Derek Stirewalt, M., Jerald P. Radich, M., Frederick R. Appelbaum, M., Era L Pogossova-Agadjanian, B., Kristen Marie O'Dwyer, M., Harry P. Erba, M. P., Omar Abdel-Wahab, M., Martin S. Tallman, M., Mark Litzow, M., Ehab L. Atallah, M., Selina M. Luger, M. F., ... Katherine Tarlock, M. (2020). Characteristics and Prognostic Effects of IDH Mutations across the Age Spectrum in AML: A Collaborative Analysis from COG, SWOG, and ECOG. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1182/blood-2020-134211>
- Saretzki, G., Armstrong, L., Leake, A., Lako, M., & von Zglinicki, T. (2004). Stress Defense in Murine Embryonic Stem Cells Is Superior to That of Various Differentiated Murine Cells. *Stem Cells*, *22*(6), 962–971. <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.22-6-962>
- Sattler, M., Verma, S., Shrikhande, G., Byrne, C. H., Pride, Y. B., Winkler, T., Greenfield, E. A., Salgia, R., & Griffin, J. D. (2000). The BCR/ABL Tyrosine Kinase Induces Production of Reactive Oxygen Species in Hematopoietic Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(32), 24273–24278. <https://doi.org/10.1074/JBC.M002094200>
- Schnittger, S., Schoch, C., Dugas, M., Kern, W., Staib, P., Wuchter, C., Sauerland, C. M., Serve, H., Bü, T., Haferlach, T., & Hiddemann, W. (2002). Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *100*, 59–66. <https://doi.org/10.1182/blood.v100.1.59>
- Schreck, R., Rieberl, 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. In *The EMBO Journal* (Vol. 10, Issue 8).
- Semenza, G. L., Roth, P. H., Fang, H. M., & Wang, G. L. (1994). Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(38), 23757–23763. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)31580-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)31580-6)
- Shao, J., White, C. C., Dabrowski, M. J., Kavanagh, T. J., Eckert, M. L., & Gallagher, E. P. (2008). The Role of Mitochondrial and Oxidative Injury in BDE 47 Toxicity to Human Fetal Liver Hematopoietic Stem Cells. *Toxicological Sciences*, *101*(1), 81–90. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFM256>
- Shi, J., Zuo, H., Ni, L., Xia, L., Zhao, L., Gong, M., Nie, D., Gong, P., Cui, D., Shi, W., & Chen, J. (2014). An IDH1 mutation inhibits growth of glioma cells via GSH depletion and ROS generation. *Neurological Sciences*, *35*(6), 839–845. <https://doi.org/10.1007/S10072-013-1607-2/FIGURES/5>
- \*Shih, A. H., Abdel-Wahab, O., Patel, J. P., & Levine, R. L. (2012). The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nature Publishing Group*, *12*. <https://doi.org/10.1038/nrc3343>
- Shin, S. Y., Lee, S. T., Kim, H. J., Cho, E. H., Kim, J. W., Park, S., Jung, C. W., & Kim, S. H. (2016). Mutation profiling of 19 candidate genes in acute myeloid leukemia suggests significance of DNMT3A mutations. *Oncotarget*, *7*(34), 54825. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.10240>
- Simsek, T., Kocabas, F., Zheng, J., Deberardinis, R. J., Mahmoud, A. I., Olson, E. N., Schneider, J. W., Zhang, C. C., & Sadek, H. A. (2010). The Distinct Metabolic Profile of Hematopoietic Stem Cells Reflects Their Location in a Hypoxic Niche. *Cell Stem Cell*, *7*(3), 380–390. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2010.07.011>

- \*Snowden, J. A., O'Connell, S., Hawkins, J., Dalley, C., Jack, A., Mannari, D., McNamara, C., Scott, M., Shenton, G., Soilleux, E., & MacBeth, F. (2017). Haematological cancers: Improving outcomes. A summary of updated NICE service guidance in relation to Specialist Integrated Haematological Malignancy Diagnostic Services (SIHMDS). *Journal of Clinical Pathology*, *70*(6), 461–468. <https://doi.org/10.1136/JCLINPATH-2016-204029>
- \*Sperling, A. S., Gibson, C. J., & Ebert, B. L. (2016). The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.112>
- Sriskanthadevan, S., Jeyaraju, D. v., Chung, T. E., Prabha, S., Xu, W., Skrtic, M., Jhas, B., Hurren, R., Gronda, M., Wang, X., Jitkova, Y., Sukhai, M. A., Lin, F. H., Maclean, N., Laister, R., Goard, C. A., Mullen, P. J., Xie, S., Penn, L. Z., ... Schimmer, A. D. (2015). AML cells have low spare reserve capacity in their respiratory chain that renders them susceptible to oxidative metabolic stress. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *125*(13), 2120. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2014-08-594408>
- Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J. L., Brothers, G. M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J. M., Siderovski, D. P., & Mak, T. W. (1998). Negative Regulation of PKB/Akt-Dependent Cell Survival by the Tumor Suppressor PTEN. *Cell*, *95*(1), 29–39. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81780-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81780-8)
- Stamler, J. S., Simon, D. I., Osborne, J. A., Mullins, M. E., Jaraki, O., Michel, T., Singel, D. J., & Loscalzo, J. (1992). S-Nitrosylation of proteins with nitric oxide: Synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(1), 444–448. <https://doi.org/10.1073/PNAS.89.1.444>
- Stanicka, J., Russell, E. G., Woolley, J. F., & Cotter, T. G. (2015). NADPH Oxidase-generated Hydrogen Peroxide Induces DNA Damage in Mutant FLT3-expressing Leukemia Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*(15), 9348. <https://doi.org/10.1074/JBC.M113.510495>
- \*Stratton, M. R., Campbell, P. J., & Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature*, *458*(7239), 719. <https://doi.org/10.1038/NATURE07943>
- \*Sullivan, L. B., & Chandel, N. S. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. In *Cancer & Metabolism* (pp. 99–116). <https://doi.org/10.1186/2049-3002-2-17>
- Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L. M., Liu, D. R., Aravind, L., & Rao, A. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, *324*(5929), 930–935. <https://doi.org/10.1126/science.1170116>
- Takubo, K., Goda, N., Yamada, W., Iriuchishima, H., Ikeda, E., Kubota, Y., Shima, H., Johnson, R. S., Hirao, A., Suematsu, M., & Suda, T. (2010). Regulation of the HIF-1 $\alpha$  Level Is Essential for Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cell*, *7*, 391–402. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.020>
- Takubo, K., Nagamatsu, G., Kobayashi, C. I., Nakamura-Ishizu, A., Kobayashi, H., Ikeda, E., Goda, N., Rahimi, Y., Johnson, R. S., Soga, T., Hirao, A., Suematsu, M., & Suda, T. (2013). Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, *12*(1), 49–61. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.10.011>
- Tan, W. Q., Wang, K., Lv, D. Y., & Li, P. F. (2008). Foxo3 $\alpha$  Inhibits Cardiomyocyte Hypertrophy through Transactivating Catalase. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(44), 29730–29739. <https://doi.org/10.1074/JBC.M805514200>
- Tang, X., Fu, X., Liu, Y., Yu, D., Cai, S. J., & Yang, C. (2020). Blockade of glutathione metabolism in IDH1-mutated glioma. *Molecular Cancer Therapeutics*, *19*(1), 221–230. <https://doi.org/https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-19-0103>
- Thol, F., Damm, F., & Mischak-Weissinger, E. M. (2011). Prognostic Significance of ASXL1 Mutations in Patients With Myelodysplastic Syndromes. *Article in Journal of Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.4938>
- Tiburcio, P. D. B., Gillespie, D. L., Jensen, R. L., & Huang, L. E. (2020). Extracellular glutamate and IDH1R132H inhibitor promote glioma growth by boosting redox potential. *Journal of Neuro-Oncology*, *146*(3), 427–437. <https://doi.org/10.1007/S11060-019-03359-W/FIGURES/5>

- \*Tommasini-Ghelfi, S., Murnan, K., Kouri, F. M., Mahajan, A. S., May, J. L., & Stegh, A. H. (2019). Cancer-associated mutation and beyond: The emerging biology of isocitrate dehydrogenases in human disease. *Science Advances*, 5(5), 4543–4565. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw4543>
- Tothova, Z., Kollipara, R., Huntly, B. J., Lee, B. H., Castrillon, D. H., Cullen, D. E., McDowell, E. P., Lazo-Kallanian, S., Williams, I. R., Sears, C., Armstrong, S. A., Passegué, E., DePinho, R. A., & Gilliland, D. G. (2007). FoxOs Are Critical Mediators of Hematopoietic Stem Cell Resistance to Physiologic Oxidative Stress. *Cell*, 128(2), 325–339. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.01.003>
- Tran, H., Brunet, A., Grenier, J. M., Datta, S. R., Fornace Jr, A. J., DiStefano, P. S., Chiang, L. W., & Greenberg, M. E. (1999). DNA Repair Pathway Stimulated by the Forkhead Transcription Factor FOXO3a Through the Gadd45 Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 14, 30. <https://doi.org/10.1126/science.1068712>
- Tung, E. W. Y., Philbrook, N. A., MacDonald, K. D. D., & Winn, L. M. (2012). DNA Double-Strand Breaks and DNA Recombination in Benzene Metabolite–Induced Genotoxicity. *Toxicological Sciences*, 126(2), 569–577. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFS001>
- \*Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2006.07.001>
- \*Vardiman, J. W., Harris, N. L., & Brunning, R. D. (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 100(7), 2292–2302. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2002-04-1199>
- Vilaplana-Lopera, N., Almaghrabi, R., Papatzikas, G., Cuminetti, V., Jeeves, M., González, E., Cunningham, A., Erdem, A., Schnuetgen, F., Raghavan, M., Potluri, S., Cazier, J.-B., Schuringa, J. J., Reed, M. A., Arranz, L., Günther, U. L., & Garcia, P. (2021). Crosstalk between AML and stromal cells triggers acetate secretion through the metabolic rewiring of stromal cells. *BioRxiv*, 2021.01.21.427406. <https://doi.org/10.1101/2021.01.21.427406>
- Walter, M. J., Shen, D., Ding, L., Shao, J., Koboldt, D. C., Chen, K., Larson, D. E., McLellan, M. D., Dooling, D., Abbott, R., Fulton, R., Magrini, V., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., O’Laughlin, M., Fan, X., Grillo, M., Witowski, S., Heath, S., ... Graubert, T. A. (2012). Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 366(12), 1090–1098. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1106968>
- Ward, P. S., Lu, C., Cross, J. R., Abdel-Wahab, O., Levine, R. L., Schwartz, G. K., & Thompson, C. B. (2013). The potential for isocitrate dehydrogenase mutations to produce 2-hydroxyglutarate depends on allele specificity and subcellular compartmentalization. *Journal of Biological Chemistry*, 288(6), 3804–3815. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.435495>
- Ward, P. S., Patel, J., Wise, D. R., Abdel-Wahab, O., Bennett, B. D., Coller, H. A., Cross, J. R., Fantin, V. R., Hedvat, C. v., Perl, A. E., Rabinowitz, J. D., Carroll, M., Su, S. M., Sharp, K. A., Levine, R. L., & Thompson, C. B. (2010). The Common Feature of Leukemia-Associated IDH1 and IDH2 Mutations Is a Neomorphic Enzyme Activity Converting  $\alpha$ -Ketoglutarate to 2-Hydroxyglutarate. *Cancer Cell*, 17(3), 225–234. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.01.020>
- Wasylyk, C., & Wasylyk, B. (1993). Oncogenic conversion of Ets affects redox regulation in-vivo and in-vitro. *Nucleic Acids Research*, 21(3), 523–529. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/nar/21.3.523>
- Whitman, S. P., Archer, K. J., Feng, L., Baldus, C., Becknell, B., Carlson, B. D., Carroll, A. J., Mrózek, K., Vardiman, J. W., George, S. L., Kowitz, J. E., Larson, R. A., Bloomfield, C. D., & Caligiuri, M. A. (2001). Absence of the Wild-Type Allele Predicts Poor Prognosis in Adult de Novo Acute Myeloid Leukemia with Normal Cytogenetics and the Internal Tandem Duplication of FLT3: A Cancer and Leukemia Group B Study 1. *CANCER RESEARCH*, 61, 7233–7239. <http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/61/19/7233/2488866/ch1901007233.pdf>
- Williams Parsons, D., Jones, S., Zhang, X., Cheng-Ho Lin, J., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.-M., Gallia, G. L., Olivi, A., McLendon, R., Ahmed Rasheed, B., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D. A., Tekleab, H., Diaz Jr, L. A., ... Kinzler, K. W. (2008).



- An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science*, 321(5897), 1807. <https://doi.org/10.1126/science.1164382>
- Wise, D. R., Ward, P. S., Shay, J. E. S., Cross, J. R., Gruber, J. J., Sachdeva, U. M., Platt, J. M., Dematteo, R. G., Simon, M. C., & Thompson, C. B. (2011). Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of  $\alpha$ -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *PNAS*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117773108>
- Xiao, H., Jedrychowski, M. P., Schweppe, D. K., Huttlin, E. L., Yu, Q., Heppner, D. E., Li, J., Long, J., Mills, E. L., Szpyt, J., He, Z., Du, G., Garrity, R., Reddy, A., Vaites, L. P., Paulo, J. A., Zhang, T., Gray, N. S., Gygi, S. P., & Chouchani, E. T. (2020). A Quantitative Tissue-Specific Landscape of Protein Redox Regulation during Aging. *Cell*, 180(5), 968-983.e24. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.02.012>
- Xu, Q., Li, Y., Lv, N., Jing, Y., Xu, Y., Li, Y., Li, W., Yao, Z., Chen, X., Huang, S., Wang, L., Li, Y., & Yu, L. (2017). Correlation between isocitrate dehydrogenase gene aberrations and prognosis of patients with acute myeloid leukemia: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Cancer Research*, 23(15), 4511–4522. <https://doi.org/https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2628>
- Xu, W., Yang, H., Liu, Y., Yang, Y., Wang, P., Kim, S. H., Ito, S., Yang, C., Wang, P., Xiao, M. T., Liu, L. X., Jiang, W. Q., Liu, J., Zhang, J. Y., Wang, B., Frye, S., Zhang, Y., Xu, Y. H., Lei, Q. Y., ... Xiong, Y. (2011). Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell*, 19(1), 17–30. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.12.014>
- Yamazaki, S., Iwama, A., Takayanagi, S. I., Morita, Y., Eto, K., Ema, H., & Nakauchi, H. (2006). Cytokine signals modulated via lipid rafts mimic niche signals and induce hibernation in hematopoietic stem cells. *The EMBO Journal*, 25(15), 3515–3523. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7601236>
- \*Yan, H., Williams, D., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B. A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G. J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K. W., Velculescu, V. E., Vogelstein, B., & Bigner, D. D. (2009). IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *N Engl J Med*, 360, 765–773. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808710>
- Yang, J., Groen, A., Lemeer, S., Jans, A., Slijper, M., Roe, | S Mark, den Hertog, J., & Barford, D. (2007). Reversible Oxidation of the Membrane Distal Domain of Receptor PTPR Is Mediated by a Cyclic Sulfenamide. *Biochemistry*, 46, 709–719. <https://doi.org/10.1021/bi061546m>
- Yen, K., Travins, J., Wang, F., David, M. D., Artin, E., Straley, K., Padyana, A., Gross, S., DeLaBarre, B., Tobin, E., Chen, Y., Nagaraja, R., Choe, S., Jin, L., Konteatis, Z., Cianchetta, G., Saunders, J. O., Salituro, F. G., Quivoron, C., ... Author, C. (2017). AG-221, a First-in-Class Therapy Targeting Acute Myeloid Leukemia Harboring Oncogenic IDH2 Mutations. *Cancer Discovery*. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-1034>
- Yilmaz, Ö. H., Valdez, R., Theisen, B. K., Guo, W., Ferguson, D. O., Wu, H., & Morrison, S. J. (2006). Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature* 2006 441:7092, 441(7092), 475–482. <https://doi.org/10.1038/nature04703>
- \*Ying, W. (2007). NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH in Cellular Functions and Cell Death: Regulation and Biological Consequences. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(2), 179–206. <https://doi.org/10.1089/ARS.2007.1672>
- Yu, W. M., Liu, X., Shen, J., Jovanovic, O., Pohl, E. E., Gerson, S. L., Finkel, T., Broxmeyer, H. E., & Qu, C. K. (2013). Metabolic regulation by the mitochondrial phosphatase PTPMT1 is required for hematopoietic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell*, 12(1), 62–74. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.11.022>
- Zhang, J., Grindley, J. C., Yin, T., Jayasinghe, S., He, X. C., Ross, J. T., Haug, J. S., Rupp, D., Porter-Westpfahl, K. S., Wiedemann, L. M., Wu, H., & Li, L. (2006). PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention. *Nature* 2006 441:7092, 441(7092), 518–522. <https://doi.org/10.1038/nature04747>
- \*Zhao, R. Z., Jiang, S., Zhang, L., & Yu, Z. bin. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling. *International Journal of Molecular Medicine*, 44(1), 3–15. <https://doi.org/10.3892/IJMM.2019.4188/HTML>

- Zhao, S., & Guan, K. L. (2010). IDH1 mutant structures reveal a mechanism of dominant inhibition. *Cell Research*, 20(12), 1279–1281. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.160>
- Zhao, S., Lin, Y., Xu, W., Jiang, W., Zhai, Z., Wang, P., Yu, W., Li, Z., Gong, L., Peng, Y., Ding, J., Lei, Q., Guan, K. L., & Xiong, Y. (2009). Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 $\alpha$ . *Science*, 324(5924), 261–265. <https://doi.org/10.1126/science.1170944>

\*review