



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

IMPDH 1 ja 2 rakenteelliset erot syöpälääkekehityksessä

Ilona Nieminen

Kemia
LuK-tutkielma
Laajuus: 6 op

03.04.2024

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Pääaine: Kemia

Tekijä: Ilona Nieminen

Otsikko: IMPDH 1 ja 2 rakenteelliset erot syöpälääkekehityksessä

Ohjaaja: Kari Kopra

Sivumäärä: 25 sivua

Päivämäärä: 03.04.2024

Inosiini-5'-monofosfaatti dehydrogenaasi (IMPDH) on välttämätön entsyymi puriininukleotidien biosynteesissä, missä se katalysoi solulle tärkeän energia- ja signalointimolekyylin guanosiinitrifosfaatin (GTP) muodostumista. Biosynteesin ensimmäisessä vaiheessa inosiinimonofosfaatti (IMP) muuttuu oksidatiivisessa reaktiossa ksantiinimonofosfaatiksi ja samalla nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi (NAD^+) pelkistyy NADH:ksi.

Ihmisellä IMPDH:sta esiintyy kaksi muotoa, joiden sekvenssien samankaltaisuus on noin 84 %. IMPDH 1:ta esiintyy useimmissa soluissa pieniä pitoisuuksia, kun taas IMPDH 2 esiintyy erityisesti nopeasti jakautuvissa soluissa. IMPDH on tetrameerinen proteiini, jonka monomeerit sisältävät katalyyttisen ja säätelevän alayksikön. Nukleotidien sitoutuminen säätelevän alayksikön nukleotidien sitoutumiskohtiin aiheuttaa entsyymien multimerisoitumisen ja erityisesti GTP:n sitoutuminen estää nukleotidibiosynteesiä. IMPDH 1 multimerisoituminen johtaa oktameerisen rakenteen pakkautumiseen ja kaartumiseen, josta seuraa täydellinen nukleotidibiosynteesin estyminen, kun taas IMPDH 2 pysyy multimerisoituneenakin osittain aktiivisena.

Yleisimpiä allosteerisia säätelytekijöitä IMPDH:n molemmille tyypeille solussa ovat adensiinitrifosfaatti (ATP), GTP, IMP ja NAD^+ . IMPDH:n allosteeriset säätelijät ja IMPDH:n toimintaa inhihoivat yhdisteet ovat osoittautuneet lupaaviksi lääkekandidaateiksi syövän hoitoon. Ensimmäinen tunnettu IMPDH:n inhibiittori on mykofenolihappo, joka sitoutuu NAD^+ :n paikalle estäen biosynteesin etenemisen. Myös tiatsofuriini vuorovaikuttaa NAD^+ :n sitoutumiskohtaan kanssa toimien ei-kilpailevana inhibiittorina NAD^+ :lle. Monet kehitetyistä IMPDH:n inhibiittoreista ovat parhaillaan kliinisissä kokeissa, mutta yhtään hyväksyttyä IMPDH:n inhibiittoria ei ole vielä lääkinnällisessä käytössä syövän hoidossa. IMPDH:n aktiivisuuteen vaikuttavia lääkkeitä on kehitetty myös muiden sairauksien hoitoon.

Sisällysluettelo

1. Johdanto
2. Ihmisen IMPDH
3. IMPDH:n toiminta solussa
 - 3.1 IMPDH:n rakenteen merkitys katalyyttiselle aktiivisuudelle ja entsyymin katalysoiman reaktion mekanismi
 - 3.2 IMPDH:n nukleotidivälitteinen säätely
4. IMPDH:n inhibiittorit
 - 4.1 Mykofenolihapon, ribaviriinin ja tiatsofuriini antitumoraalinen vaikutus ja solujen jakautumisen inhibitio
 - 4.2 Muita lääkekandidaateiksi soveltuvia IMPDH:n inhibiittoreita
5. Johtopäätökset

Lyhenneluettelo

ADP = adensiinidifosfaatti

AMP = adensiinimonofosfaatti

ATP = adensiinitrifosfaatti

DNA = deoksiribonukleiinihappo

E-XMP* = kovalenttinen tioimidaatti väliaine

GDP = guansiinidifosfaatti

GMP = guansiinimonofosfaatti

GMPS = GMP-syntetaasi

GTP = guansiinitrifosfaatti

IMP = inosiinimonofosfaatti

IMPDH = inosiini-5'-monofosfaatti dehydrogenaasi

NADH / NAD⁺ = nikotiiniamidiadeniininukleotidi

NMNAT = nikotiinamidimononukleotidiadenyylitransferaasi

RNA = ribonukleiinihappo

TAD = tiatsoli-4-karboksamidiadeniininukleotidi

XMP = ksantiini monofosfaatti

1. Johdanto

Inosiini-5'-monofosfaatti dehydrogenaasi (engl. *inosine-5'-monophosphate dehydrogenase*, IMPDH) on välttämätön entsyymi puriininukleotidien biosynteesissä, jossa se katalysoi ensimmäisen vaiheen guanosiinitrifosfaatin biosynteesissä. Biosynteesissä IMPDH katalysoi inosiinimonofosfaatin (engl. *inosine monophosphate*, IMP) oksidatiivisen reaktion ksantiinimonofosfaatiksi (engl. *xanthosine monophosphate*, XMP) ja samalla nikotiiniamidiadeniininukleotidi (NAD^+) pelkistyy. Reaktion jälkeen XMP muutetaan välittömästi guanosiinimonofosfaatiksi (GMP) GMP-syntetaasin (GMPS) katalysoimassa reaktiossa. GMP muutetaan edelleen guanosiinidifosfaatin (GDP) kautta GTP:ksi erillisissä reaktioissa, joista jokaisen katalysoi oma entsyymi (Burrell ja Kollman 2022).

GTP on solun tärkeä viesti-, rakennus- ja energiamolekyyli. Guaniininukleotideja käytetään esimerkiksi ribonukleiinihapon (RNA) ja deoksiribonukleiinihapon (DNA) rakenneosina, translaation energianlähteenä, G-proteiinien kofaktoreina sekä allosteerisessa säätelyssä ja signaalimolekyyleinä (Hedstrom 2009). GTP:n pitoisuus solussa muuttuu usein eri sairaustiloissa, ja esimerkiksi useimmissa syöpässä GTP:n pitoisuus kasvaa voimakkaasti.

IMPDH on tetrameerinen proteiini, jonka monomeerit sisältävät katalyyttisen ja säätelevän alayksikön. Katalyyttisessä alayksikössä tapahtuu IMPDH:n katalysoima puriininukleotidien biosynteesi. Säätelevä alayksikkö ei kaikilla organismeilla ole välttämätön oksidatiivisessa reaktiossa, jossa IMP hapettuu XMP:ksi, mutta sillä on tärkeä tehtävä entsyymin allosteerisessa säätelyssä sitoen nukleotideja rakenteeseen. IMPDH voi sitoutua toiseen tetrameeriseen proteiiniin ja muodostaa oktameerisiä rakenteita. Oktameeriset proteiinit voivat edelleen liittyä yhteen ja muodostaa suuria filamenttisia rakenteita. Filamenttisten rakenteiden on osoitettu vaikuttavan IMPDH:n aktiivisuuteen (Buey ja muut 2015).

Ihmisillä IMPDH:sta esiintyy kaksi hieman toisistaan poikkeavaa muotoa, joiden sekvenssin samankaltaisuus on jopa 84 %. Tyypin 1 IMPDH:ta tuotetaan jatkuvasti solussa ja sitä esiintyy monissa kudoksissa yleensä pieniä määriä. IMPDH 2:sta esiintyy lähinnä nopeasti jakautuvissa soluissa suurina pitoisuuksina (Carr ja muut 1993). Esimerkiksi syöpäsolut ovat nopeasti jakautuvia soluja. Mutaatiot proteiinia tuottavissa geneeissä aiheuttavat oireiltaan ja vaikeusasteeltaan vaihtelevia sairauksia ihmisillä, kuten erilaisia sokeuksia. (Burrell ja Kollman 2022)

Syöpähoidollisesta näkökulmasta IMPDH 2 on osoittautunut hyvin mielenkiintoiseksi entsyymiksi. Syöpäsolut pystyvät tuottamaan guaniininukleotideja lähinnä vain IMPDH:n katalysoiman reaktion kautta eli IMPDH on usein guaniininukleotidien biosynteesiä rajoittava entsyymi. Tutkimus on keskittynyt IMPDH:n toiminnan inhiboimiseen solussa, jolloin guaniininukleotideja ei pystytä tuottamaan tarpeeksi nopeasti jakautuvien syöpäsolujen tarpeisiin. Guaniininukleotidien puute solussa johtaa adenosinotriposfaatin (ATP) vähenemiseen, sillä GTP toimii kofaktorina ATP:n biosynteesissä. Sekä GTP:n että ATP:n puute solussa vaikuttaa DNA:n ja RNA:n synteesiin. (Shu ja Nair 2008)

Guaniininukleotidit ovat välttämättömiä syöpäsoluille, sillä syöpäsolut käyttävät niitä energianlähteenä sekä DNA:n monistamisessa. IMPDH:n biosynteesin inhibitio johtaa guaniininukleotidien määrän vähenemiseen ja tämän vuoksi entsyymiä pidetään hyvin potentiaalisena lääkekohteena syöpälääkkeiden kehityksessä (Hedstrom 2009). Vaikka monet IMPDH:n inhibiittorit ovat osoittaneet hyvin lupaavia tuloksia, ei tällä hetkellä ole käytössä ainuttakaan IMPDH:n toimintaa estävää lääkettä syöpähoidossa. IMPDH:n aktiivisuuteen vaikuttavia lääkkeitä on kehitetty myös lukuisien muiden sairauksien hoitoon. (Shu ja Nair 2008)

IMPDH:n toiminnan inhibitio voi olla seurausta esimerkiksi GTP:n ja ATP:n indusoimasta allosteerisesta säätelystä. Allosteerisella säätelyllä tarkoitetaan entsyymien aktiivisuuteen vaikuttavia muutoksia, jotka ovat seurausta jonkin toisen vaikuttajamolekyylin sitoutumisesta entsyymien aktiiviseen kohtaan tai sen läheisyyteen. Tyypillistä kaikille allosteerisen säätelyn mekanismeille on, että ne lisäävät entsyymien kykyä vastustaa erilaisia palautteenanto- ja takaisinkytkentämekanismeja. Allosteerinen säätely on hyvin yleistä solussa ja moni solun oma molekyyli toimii entsyymien allosteerisena säätelijänä. Allosteerinen säätely voi lisätä entsyymien aktiivisuutta tai pienentää sitä. (Buey ja muut 2022)

Kirjallisuuskatsauksessa esitellään ihmisen IMPDH:n kahden eri tyypin rakenteellisia ja toiminnallisia eroavaisuuksia, jotka voisivat olla potentiaalisia kohteita syöpälääkekehityksessä. Syöpälääkekehitykseen pohjautuva tutkielma keskittyy erityisesti IMPDH:n allosteeriseen säätelyyn solun nukleotidien toimesta ja miten allosteerisen säätelyn vaikutukset eroavat ihmisen IMPDH:n eri muodoilla. Myös IMPDH:n aktiivisuuden muutoksia tarkastellaan tutkielmassa syöpälääkekehityksen näkökulmasta. Tutkielmassa esitellään IMPDH:n inhibiittoreita ja avataan niiden vaikutusmekanismeja solussa. Lopuksi otetaan katsaus tulevaisuudessa potentiaalsiin syöpälääkkeisiin, joiden vaikuttavana kohteena on IMPDH.

2. Ihmisen IMPDH

Ihmisellä IMPDH:n tärkein tehtävä on katalysoida guaniin nukleotidien biosynteesin ensimmäinen vaihe. Guaniin nukleotideja voidaan tuottaa myös muilla vaihtoehtoisilla reaktioreiteillä, joita kutsutaan kierrätysreiteiksi. Kierrätysreitit eivät kuitenkaan ole yhtä tehokkaita tuottamaan guaniin nukleotideja solun tarpeisiin kuin IMPDH:n katalysoima reaktio (Hedstrom 2009). IMPDH:n on myös sanottu olevan solun energiatilasta kertova aistin, sillä solun energiamolekyylit ATP ja GTP säätelevät allosteerisesti IMPDH:n toimintaa solun energiatilan mukaan (Ji ja muut 2006). IMPDH:lla on vaikutusta myös moniin muihin solun toimintoihin, kuten DNA:n replikaatioon. Tutkimustieto IMPDH:sta kasvaa jatkuvasti ja sen roolin solussa uskotaan olevan monimutkaisempi mitä aiemmin on ajateltu.

Ihmisillä esiintyy kaksi IMPDH geeniä, IMPDH 1 kromosomissa 7 ja IMPDH 2 kromosomissa 3 (Natsumeda ja muut 1990). Geenit tuottavat rakenteellisesti ja kineettisiltä ominaisuuksiltaan kaksi hyvin samankaltaista entsyymiä, joiden sekvenssin samankaltaisuus on jopa 84 %. hIMPDH 1:stä esiintyy myös kaksi pidempää versiota, jotka ovat seurausta vaihtoehtoisesta silmukoinnista. Vaihtoehtoisessa silmukoinnissa myös osa eksoneista poistetaan, jolloin tumasta poistuva lähetti-RNA (mRNA) sisältää ohjeen hieman erilaisen proteiinin rakentamiseen. hIMPDH 1:stä on myös tunnistettu useita mutaatioiden aiheuttamia polymorfismeja, mutta hIMPDH 2 ei ole yhtä monimuotoinen ja siitä on löydetty vain vähän polymorfismia. (Hedstrom 2009)

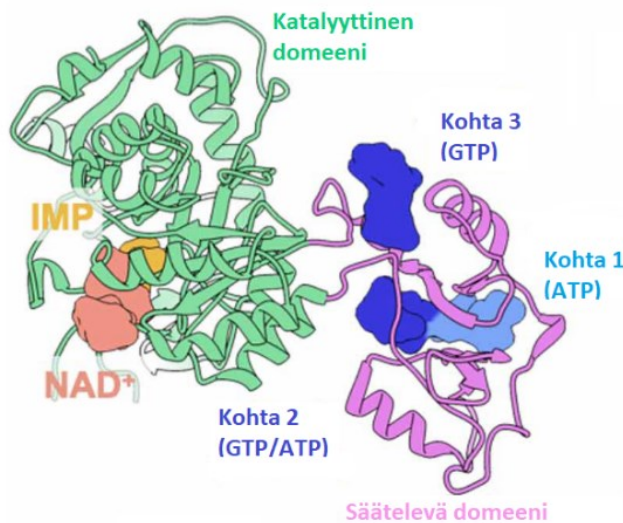
Ihmisellä IMPDH 1:stä esiintyy monissa kudoksissa, kuten verkkokalvolla, pernassa ja lepäävässä perifeerisessä veressä yksitumaisissa soluissa (engl. *resting peripheral blood mononuclear cells*) usein pieniä määriä. Erityisesti normaaleissa leukosyyteissä on havaittu tyypin 1 entsyymien aktiivisuutta, jossa se huolehtii puriininukleotidien riittävästä varastosta immuunisoluissa (Pan ja muut 2016). IMPDH 2:sta esiintyy ihmisellä erityisesti nopeasti jakautuvissa soluissa, kuten syöpäsoluissa, joissa guaniin nukleotidien ja energian tarve on suuri (Burrell ja Kollman 2022).

Pistemutaatiot IMPDH:ta tuottavissa geneeissä aiheuttavat erilaisia sairauksia ihmisellä. Esimerkiksi mutaatiot IMPDH 1:ssä on yhdistetty autosomaaliin dominoivaan sokeuteen, kuten retinis pigmentosaan tai Leberin synnyntäiseen amauroosiin. Puolestaan mutaatiot IMPDH 2:ssa ovat vähemmän tutkittuja, mutta joitakin mutaatioita on yhdistetty nuorten neuropatioihin. (Burrell ja Kollman 2022)

3. IMPDH:n toiminta solussa

3.1 IMPDH:n rakenteen merkitys katalyyttiselle aktiivisuudelle ja entsyymin katalysoiman reaktion mekanismi

IMPDH on tetrameerinen proteiini, joka koostuu neljästä monomeerista. Kukaan monomeeri sisältää katalyyttisen ja säätelevän alayksikön (kuva 1). Solussa IMPDH voi multimerisoitua, jolloin useampi tetrameerinen proteiini liittyy yhteen. IMPDH:n multimerisoinnista ja nukleotidibiosynteesin aktiivisuutta solussa säätelevät monet nukleotidit, kuten GTP ja ATP, ja muut yhdisteet, kuten IMP ja NAD^+ . Multimerisointuminen on seurausta nukleotidien sitoutumisesta entsyymin säätelevään alayksikköön. (Hedstrom 2009)



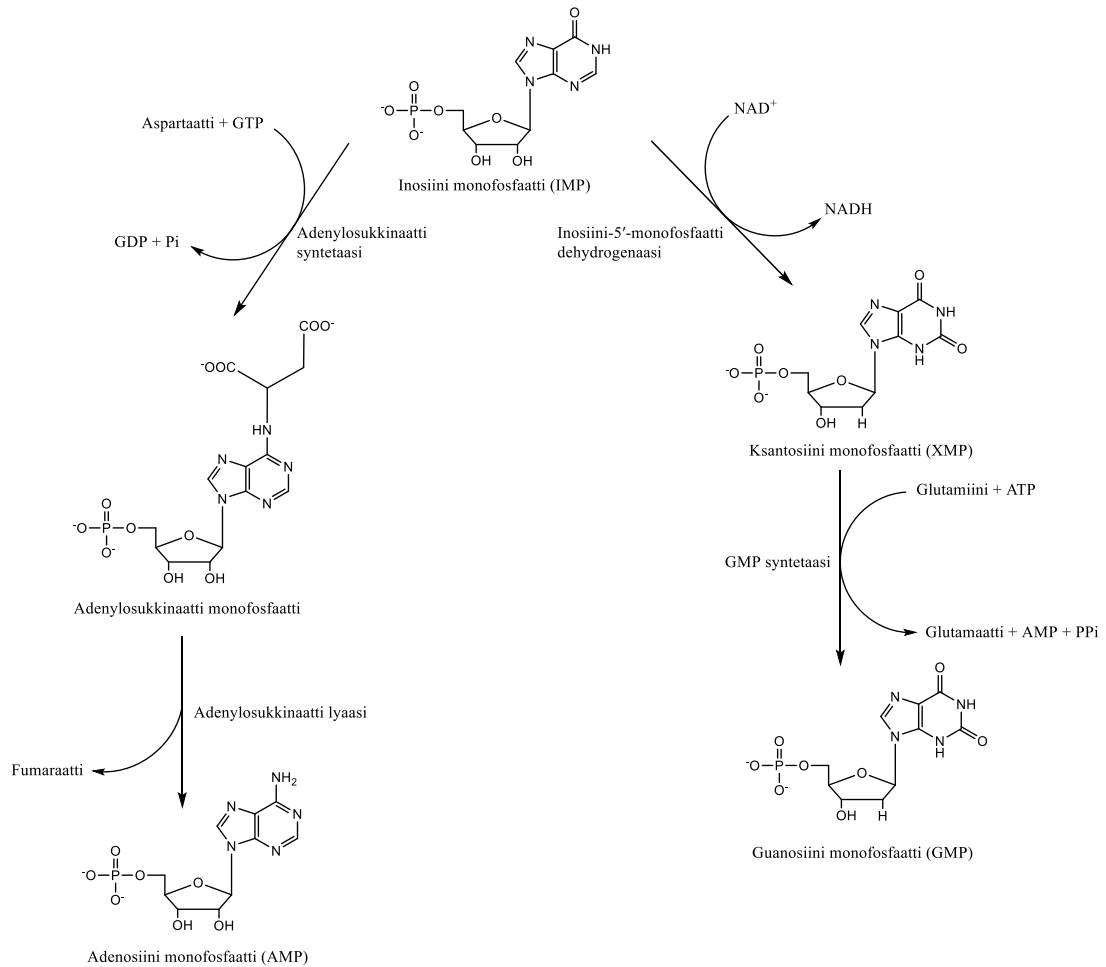
Kuva 1. IMPDH:n monomeerin rakenne. IMPDH on tetrameerinen proteiini, jonka monomeeri sisältää katalyyttisen domeenin (vihreä) ja säätelevän domeenin (kuivassa pinkki). Katalyyttinen domeeni sitoo IMP:n ja NAD^+ :n aktiiviseen keskukseen. Säätelevä domeeni sisältää kolme allosteerista nukleotidien sitoutumiskohtaa, jotka sitovat joko GTP:tä tai ATP:tä tai molempia. Kuvan monomeeri on estyneessä tilassa, koska sitoutumiskohtiin 2 ja 3 on sitoutunut GTP. Kuva on muokattu avoimen julkaisun artikkelista, jonka on julkaissut Portland Press Limited Biochemical Society:n puolesta, ja jota voidaan jatkovittää ja muokata Creative Commons Attribution License 4.0 -lisenssillä (CC BY-NCND) (Burrell ja Kollman 2022).

Säätelevä domeeni sitoo adeniini- ja guaniininukleotideja erityisiin allosteerisiin nukleotidin sitoutumiskohtiin. Säätelevä domeeni koostuu kahdesta homologisesta kystationiini beta syntetaasi domeenista eli CBS-domeenista (engl. *cystathionine beta synthase*), jotka muodostavat Bateman-domeenin. CBS-domeenien läsnäolo ei ole välttämätöntä kaikilla organismeilla IMPDH:n katalysoimalle reaktiolle, mutta säätelevällä domeenilla on tärkeä rooli entsyymin allosteerisessa säätelyssä. (Hedstrom 2009)

Säätävän domeenin nukleotidin sitoutumiskohta 1 suosii ATP:n sitoutumista, kun taas kohta 3 suosii erityisesti guanosiinidifosfaatin (GDP) ja GTP:n sitoutumista. Jokainen tunnettu IMPDH entsyymi sitoo ATP:tä sen sitoutumiskohtiinsa. ATP:n sijaan myös adenosiinimonofosfaatin (AMP) ja adenosiinidifosfaatin (ADP) sitoutuminen on mahdollista, mutta sitoutumisen fysiologisia vaikutuksia ei tunneta. AMP:n ja ADP:n on ajateltu kilpailevan sitoutumisesta kohtaan 1 ATP:n kanssa, joka on solussa vallitseva muoto (Bennett ja muut 2009). (Buey ja muut 2022)

Kohtaan 2 voi puolestaan sitoutua joko ATP tai GTP, joten ne kilpailevat solussa jatkuvasti sitoutumisesta. ATP:n ja GTP:n sitoutuminen kohtaan 2 vaikuttaa eri tavalla entsyymin rakenteeseen ja toimintaan. Nukleotidien sitoutumisen vaikutuksia kohtaan 2 käsitellään myöhemmin allosteerisen säätelyn yhteydessä. Kohtaan 2 voi sitoutua myös GDP ja ADP, mutta niiden pienen pitoisuuden ja affiniteetin seurauksena ne eivät lisää kilpailua sitoutumisesta, jos GTP:tä ja ATP:tä on solussa läsnä, sillä GTP ja ATP ovat solussa vallitsevat muodot. (Buey ja muut 2022; Burrell ja Kollman 2022)

IMPDH katalysoi GTP:n biosynteesissä ensimmäisen vaiheen, jossa IMP sitoutuu entsyymin aktiiviseen kohtaan ja se muutetaan XMP:ksi, jolloin samanaikaisesti NAD^+ vastaanottaa protonin pelkistyen NADH:ksi (kuva 2). Seuraavaksi XMP muutetaan välittömästi GMP:ksi GMPS:n katalysoimassa reaktiossa. GMP muutetaan GDP:n kautta GTP:ksi omissa reaktioissaan. (Burrell ja Kollman 2022)



Kuva 2. IMPDH:n katalysoima reaktio ja GTP:n merkitys ATP:n synteesin prekursorina. IMPDH on välttämätön entsyymi GTP:n synteesissä, jossa se katalysoi reaktion ensimmäisen vaiheen, jossa IMP muutetaan oksidatiivisessa reaktiossa XMP:ksi ja samalla NAD⁺ vastaanottaa protonin ja pelkistyy NADH:ksi.

IMPDH:n katalysoimassa reaktiossa IMP ja NAD⁺ kiinnittyvät monomeerin katalyyttiseen domeeniin, jonka kautta IMP ja NAD⁺ pääsevät osaksi entsyymin aktiivista keskusta. Katalyyttinen domeeni on (β/α)₈ tynnyriproteiini, jonka aktiivinen kohta on C-terminaalisten päiden silmukoiden β-levyissä. Katalyyttisen domeenin rakenne muistuttaa trioosi-fosfaattisomeraasi laskosta, joka tunnetaan paremmin nimellä TIM-tynnyrirakenne. Tynnyriproteiinin silmukka sisältää katalyyttisen kysteini aminohapon ja C-päätteisen segmentin, joka on yhdistynyt katalyyttisen kysteiniin kanssa yksiarvoisen kationin välityksellä. Tynnyriproteiini sisältää myös erityisen läpän, joka vaikuttaa reaktion säätelyyn. Rakenteiden joustavuus ja epäjärjestys vaihtelevat eri IMPDH entsyymin muodoilla. Näiden rakenteiden mahdollistama rakenteellinen liikkuvuus on välttämätöntä IMPDH:n aktiivisuudelle solussa. (Hedstrom 2009)

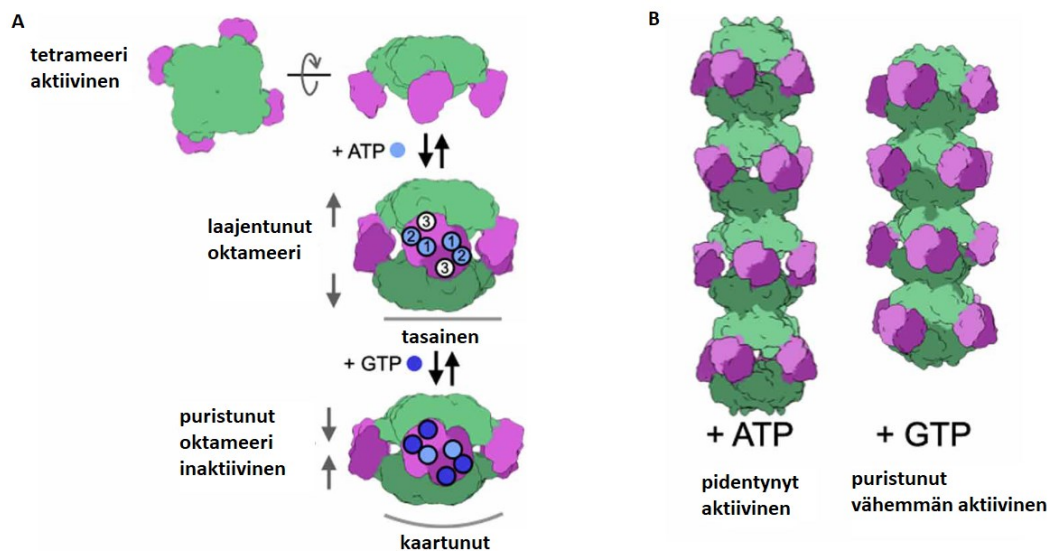
IMPDH:n katalysoiman reaktion mekanismi tunnetaan hyvin monella eri organismilla. Reaktio sisältää kaksi eri vaihetta, joista ensimmäisenä tapahtuu nopea hapetuspelkistysreaktio ja jälkimmäisenä nopeutta rajoittava hydrolyysi, jossa yhdiste hajoo lähtöaineikseen vettä lisättäessä. IMPDH:n katalysoima reaktio lähtee liikkeelle, kun katalyyttinen kysteini aminohappo hyökkää IMP:n C2 hiileen ja hydridi siirtyy NAD^+ :lle, jolloin muodostuu kovalenttinen tioimidaatti välituote (engl. *thioimidate covalent intermediate*, E-XMP*) ja pelkistynyt NADH poistuu katalyyttisen domeenin aktiivisesta kohdasta. Kun NADH on poistunut aktiivisesta kohdasta, katalyyttisen domeenin erityinen läppä on tyhjässä dinukleotidikohdassa. Lämpö sijainti mahdollistaa arginiinista ja tyrosiinista muodostuvan katalyyttisen parin sijoittumisen oikeaan kohtaan, joka puolestaan aktivoi vesimolekyylin ja lopulta E-XMP* välituote hydrolysoituu. (Buey ja muut 2022)

Reaktioiden toteutumisen kannalta olennaista on IMPDH:n aktiivisen kohdan rakenteellinen uudelleenjärjestäytymiskyky, joka mahdollistaa kahden erilaisen kemiallisen reaktion katalysoinnin. Uudelleenjärjestäytyminen on seurausta kahdesta toisensa pois sulkevasta katalyyttisen domeenin konformaatiosta. Avoin konformaatio mahdollistaa ligandin sitoutumisen aktiiviseen kohtaan, jonka jälkeen tapahtuu nopea hapetuspelkistysreaktio. Suljettu konformaatio puolestaan mahdollistaa hydrolyysin kovalenttiselle E-XMP* välituotteelle. (Buey ja muut 2022)

3.2 IMPDH:n allosteerinen säätely ja siihen osallistuvat solun nukleotidit

Guaniini- ja adeniininukleotidit toimivat IMPDH:n allosteerisina säätelijöinä sitoutuen allosteerisiin sitoutumiskohtiin aikaansaaden kahden tetrameerisen proteiinin liittymisen yhteen, jolloin muodostuu oktameerinen rakenne (kuva 3) (Burrell ja Kollman 2022). Adeniini- ja guaniininukleotidien suhde solussa vaikuttaa siihen, mihin kohtiin ne sitoutuvat säätelivässä alayksikössä.

Kun GTP:tä on paljon solussa, GTP:n sitoutuu kohtiin 2 ja 3, jolloin oktameeri ikään kuin puristuu kasaan eli rakenteesta tulee tiiviimpi ja se siirtyy alempaan aktiivisuustilaan (Buey ja muut 2015). Myös GMP ja GDP voivat sitoutua kohtiin 2 ja 3. Lisäksi oktameerin rakenne kaartuu GTP:n sitoutuessa siihen. GTP:llä on siis IMPDH:n toimintaa estävä vaikutus (Ji ja muut 2006). Jos GTP:tä on solussa vähän, ATP sitoutuu kohtiin 1 ja 2, jolloin oktameeri on laajentuneessa muodossa ja aktiivinen. Myös AMP ja ADP voivat sitoutua kohtiin 1 ja 2. ATP:n läsnäollessa oktameeri ei kaarru vaan pysyy tasaisena (Ji ja muut 2006). ATP siis aktivoi allosteerisesti IMPDH:ta. (Burrell ja Kollman 2022)



Kuva 3. IMPDH:n oktameerin aktiivisuus ja filamenttisten rakenteiden muodostuminen. A) Liuoksessa IMPDH on tetrameerinen proteiini, joka sitoo allosteerisiin nukleotidien sitoutumiskohtiin joko ATP:tä (kohdat 1 ja 2) tai GTP:tä (kohdat 2 ja 3). Nukleotidien sitoutuminen edistää tetrameerien dimerisoitumista, jolloin muodostuu oktameerinen rakenne. ATP:n läsnäollessa oktameerit ovat laajentuneet, jolloin rakenne on väljempi. Kun GTP on sitoutunut allosteeriseen nukleotidien sitoutumiskohtaan 3, oktameeri on puristunut kokoon ja on estyneessä tilassa. B) Kun GTP:tä on vähän ja ATP:tä paljon solussa, oktameerien muodostama filamentti on laajentunut ja aktiivinen. Puolestaan jos GTP:tä on paljon solussa, filamentti on puristunut kasaan ja on vähemmän aktiivisessa tilassa. Kuva on muokattu avoimen julkaisun artikkelista, jonka on julkaissut Portland Press Limited Biochemical Society'n puolesta, ja jota voidaan jatkolevittää ja muokata Creative Commons Attribution License 4.0 -lisenssillä (CC BY-NCND) (Burrell ja Kollman 2022).

Kun solussa on paljon guaniininukleotideja, IMPDH voi muodostaa filamenttisia ultrarakenteita eli multimeerejä, joissa useampi oktameerinen proteiini on kasautunut yhteen (kuva 3) (Ji ja muut 2006). Myöskin IMP:n pitoisuus solussa vaikuttaa filamenttisten ultrarakenteiden muodostumiseen (Buey ja muut 2022). Filamenttiset ultrarakenteet voivat olla joko pidentyneessä aktiivisessa tilassa, kun ATP:tä on sitoutunut paljon rakenteeseen tai kokoon puristuneessa vähemmän aktiivisessa tilassa, kun suurimpaan osaan sitoutumispaikoista on sitoutunut GTP. Myös T-solujen aktivaatio voi saada aikaan oktameerien kasautumista yhteen ja filamenttien muodostumista (Duong-Ly ja muut 2018). (Burrell ja Kollman 2022)

Guaniininukleotidit solussa siis säätelevät IMPDH:n multimerisointumista ja katalyyttistä aktiivisuutta negatiivisesti, joka rajoittaa guaniininukleotidien synteesiä. Multimerisoitunut IMPDH:n rakenne näyttäisi kuitenkin pysyvän ainakin osittain aktiivisena GTP:n määrästä riippumatta, minkä vuoksi guaniininukleotidien varastoja pystytään täydentämään nopeasti jakautuvissa ja paljon energiaa vaativissa soluissa, kuten T-soluissa ja syöpäsoluissa. (Duong-Ly ja muut 2018).

Ihmisellä IMPDH:n multimerisoituneen rakenteen kyky pysyä aktiivisena GTP pitoisuuksista riippumatta vaihtelee IMPDH:n tyyppien 1 ja 2 välillä. Molempien muotojen tapauksessa filamenttinen rakenne puristuu kasaan GTP:n sitoutuessa säätelevään domeeniin. IMPDH 1:llä rakenne kaartuu konformaatioon, jossa joka on täysin estynyt. IMPDH 1:n muodostamalla filamenttisella rakenteella ei siten uskota olevat vaikutusta aktiivisuuteen tai inhibitioon solussa. GTP:n sitoutuminen IMPDH 2:n filamentteihin edistää tasaisen konformaation muodostumista, joka pysyy osittain aktiivisena, vaikka GTP pitoisuus solussa olisi suuri. (Burrell ja Kollman 2022). IMPDH 2:lla uskotaan olevan säätelevä tehtävä solussa, sillä se pystyy tuottamaan guaniin nukleotideja korkeasta GTP:n pitoisuudesta huolimatta (Burrell ja Kollman 2022).

Säätelevään alayksikköön voi sitoutua myös dinukleotidipolyfosfaatteja, joissa kaksi nukleosidia on sitoutunut toisiinsa usean fosfaattiosan välityksellä. Dinukleotidipolyfosfaattien uskotaan osallistuvan solussa monenlaisiin tehtäviin, kuten DNA:n replikaatioon ja korjaamiseen, solunjakautumiseen, verihütaaleiden aggregoitumiseen ja apoptoosiin eli ohjelmoituun solukuolemaan. Dinukleotidipolyfosfaatit pystyvät sitoutumaan kahteen säätelevän alayksikön sitoutumiskohtaan samanaikaisesti samankaltaisella tavalla kuin yksittäinen adeniini- tai guaniin nukleotidi, mutta niiden affiniteetti sitoutumiskohtaan on erilainen. Tämän vuoksi dinukleotidipolyfosfaatit pystyvät kilpailemaan mononukleotidien kanssa sitoutumisesta säätelevään alayksikköön, jonka vuoksi niillä uskotaan olevan vaikutusta IMPDH:n rakenteen ja toiminnan säätelyssä. Dinukleotidipolyfosfaatteihin liittyvä tutkimus on kuitenkin keskeneräistä ja esimerkiksi elävässä solussa tai organismeissa tutkimukset ovat toistaiseksi puutteellisia. (Buey ja muut 2022)

Myös muita mekanismeja tunnetaan IMPDH:n aktiivisuuden säätelyssä allosteerisen säätelyn lisäksi. Näitä muita mekanismeja entsyymien aktiivisuuden hienosäätelyssä ovat esimerkiksi erilaiset post-translacionaaliset modifikaatiot entsyymien rakenteessa, kuten tiettyjen aminohappojen fosforylointi ja vaihtoehdoisen silmukoinnin yhteydessä syntyvät hieman toisistaan poikkeavat entsyymien rakenteet. Nämä entsyymien rakenteen poikkeavuudet eivät suoraan vaikuta entsyymien aktiivisuuteen, mutta ne tekevät entsyymistä vastustuskykyisemmän takaisinkytketylle allosteeriselle inhibitiolle. Tällöin entsyymien kyky sietää GTP:n inhiboivaa vaikutusta voi kasvaa. Näitä muutoksia IMPDH:n rakenteessa ja toiminnassa esiintyy erityisesti nopeasti jakautuvissa soluissa, joissa guaniin nukleotidien varastoja tulee täydentää, vaikka GTP:tä olisi solussa. (Buey ja muut 2022)

Proteiinien rakenteen allosteerinen säätely ja säätelyyn osallistuvat ligandit ovat merkittävä tutkimuskohde, minkä avulla voidaan löytää uusia lääkkeitä sairauksien hoitoon. Allosteerisia muutoksia aiheuttavat ligandit ovat hyvin selektiivisiä ja ne omaavat usein parantuneet fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jolloin esimerkiksi sitoutumisen affiniteetti voi olla suurempi kuin keinotekoisien ligandien. Lisäksi nämä ligandit ovat usein vähemmän myrkyllisiä kuin täysin keinotekoiset lääkkeet ja ne aiheuttavat myös vähemmän sivuvaikutuksia, koska ne eivät usein ole solulle vieraita molekyylejä. Allosteeristen ligandien, kuten GTP:n ja ATP:n, ominaisuudet ja niiden esiintyminen osana useiden sairauksien syntymekanismeja mahdollistavat erinomaiset lähtökohdat uusien terapeuttisten strategioiden kehittämiseen. (Buey ja muut 2022)

4. IMPDH:n inhibiittorit

IMPDH:n toimintaa inhiboivat yhdisteet voidaan jakaa kolmeen eri luokkaan sitoutumiskohdan mukaan. Inhibiittorin sitoutumiskohtana voi olla joko IMP:n tasku, NAD^+ :n tasku tai allosteerinen alayksikkö (Shu ja Nair 2008). Sitoutumiskohdan mukaan, myös inhibiittorien vaikutusmekanismit ovat erilaisia ja täten erilaisten IMPDH:n toimintaa estävien lääkekandidaattien pooli on valtava.

Suuri osa inhibiittorien tutkimuksesta on keskittynyt tyyppin 2 IMPDH entsyymiin, koska se on vallitseva muoto jakautuvissa T-soluissa ja syöpäsoluissa, joissa guaniin nukleotidien tarve on suuri. Haaste lääkekehitykselle on kuitenkin kohdistaa vaikutukset spesifisesti vain tiettyyn entsyymiin muotoon, sillä ihmisen kahden eri tyyppin IMPDH:n rakenne on hyvin samankaltainen ja nukleotidien sitoutumiskohdat sekä muut allosteeriselle säätelylle tärkeät alueet ovat rakenteellisesti hyvin konservoituneita. Viime aikoina tutkimus on lisääntynyt myös tyyppin 1 entsyymiä kohtaan, koska sillä on havaittu olevan inhiboiva vaikutus kasvainten angiogeneesiin eli verisuonien uusiomuodostukseen (Pan ja muut 2016). (Hedstrom 2009)

Lääkekehityksellisestä näkökulmasta inhibiittorien sitoutumiskohtien tunteminen ja entsyymien eri muotojen rakenteellisten eroavaisuuksien tutkimus on tärkeää, jotta voidaan kehittää spesifisiä ja tehokkaita hoitomuotoja syöpään, joiden sivuvaikutukset olisivat kuitenkin vähäisiä. Lisäksi useissa syöpäsoluissa IMPDH:n aktiivisuus voi olla moninkertaista normaaleihin soluihin verrattaessa, jolloin entsyymien aktiivisuuden alentaminen inhibiittorien avulla olisi tehokas tapa estää syöpäsolujen jakautumista, koska GTP:tä ei pystytä tuottamaan tehokkaasti muilla mekanismeilla (Naffouje ja muut 2019). Kirjallisuuskatsauksessa käsiteltäviä IMPDH:n inhibiittoreita ja mahdollisia lääkekehityksen kohteita ovat mykofenolihappo, tiatsofuriini, ribaviriini, selenatsofuriini, tienofuriini ja myriketiini. Edellä mainitut IMPDH:n inhibiittorit ovat tunnetuimpia syöpälääkekandidaatteja, jotka on osoitettu tehokkaiksi IMPDH:n toiminnan estäjiksi ja ne ovat päässeet klinisiin kokeisiin saakka.

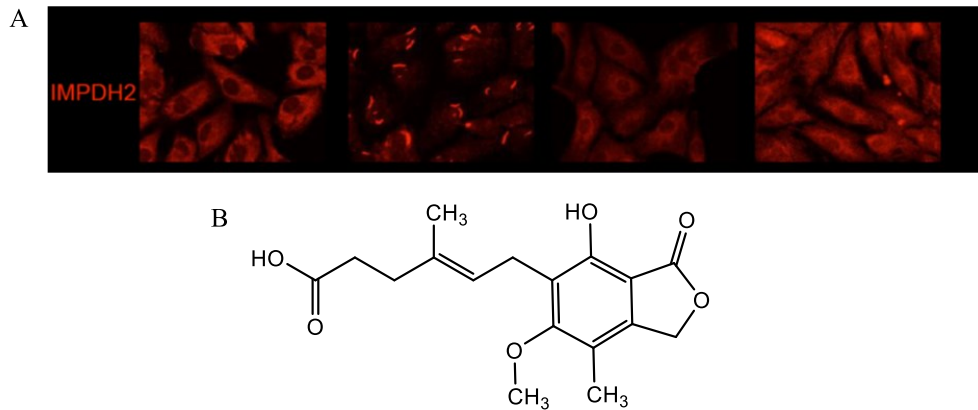
4.1 Mykofenolihapon, ribaviriinin ja tiatsofuriinin antitumoraalinen vaikutus ja solujen jakautumisen inhibitio

Mykofenolihappo (MPA) on ensimmäisiä tunnettuja inhibiittoreita ihmisen IMPDH entsyymille (kuva 4) ja sen antitumoraalinen vaikutus on tunnettu jo pitkään. MPA:n estää solujen jakautumista leukemiassa, imusolmukeisyövässä, haimasyövässä, ei-pienisoluisessa keuhkorauhassyövässä (engl. *non-small cell lung adenocarcinoma*) ja paksusuolen syövän solulinjoissa. MPA aiheuttaa myös joidenkin syöpäsolulinjojen erilaistumista tai ohjelmoitua solukuolemaa esimerkiksi rintasyövässä, eturauhassyövässä, ihosyövässä, leukemiassa ja neuroblastoomassa. (Naffouje ja muut 2019)

MPA laskee solujen GTP pitoisuutta. GTP pitoisuuden lasku riippuu kuitenkin solutyypistä ja koehenkilöstä, ja myös suurella osalla potilaista havaittu muutos GTP:n pitoisuudessa on ollut hyvin pieni tai sitä ei ole havaittu lainkaan (Tressler ja muut 1994). Suurin ongelma MPA:n käytössä syöpälääkkeenä on kuitenkin sen gastrointestinaalinen toksisuus, joka rajoittaa lääkeaineen annostelua potilaalle sekä saattaa aiheuttaa annettavan hoidon viivästymistä tai lakkauttamista (Naffouje ja muut 2019).

MPA aiheuttaa rengasmaisien proteiiniaggregaattien muodostumista ehjissä soluissa, mitkä inhiboivat IMPDH:n toimintaa (kuva 4). Solun sisälle syntyneet rengasmaiset proteiiniaggregaatit voivat purkautua reversiibelin prosessin kautta, kun soluja inkuboidaan paljon guanosiininukleotideja sisältävässä liuoksessa. Guanosiininukleotidit mahdollistavat siis tehokkaamman GTP:n tuoton ja toisaalta ne voivat palauttaa IMPDH:n aktiivisuuden. Aktiivisuuden palautuminen perustuu GTP:n sitoutumiseen entsyymin aktiivisen keskuksen nukleotidien sitoutumiskohtiin. Nukleotidien sitoutuminen rakenteeseen edistää tetrameeristen proteiinien järjestäytymisen lineaarisiksi matriisiksi, joka estää MPA:n aiheuttamaa aggregoitumista. Solunsisäinen GTP toimii siis MPA:n antagonistina, koska GTP pystyy affiniteettinsa vuoksi sitoutumaan tehokkaasti entsyymin aktiiviseen keskukseen ja siten estämään rengasmaisien proteiiniaggregaattien muodostumista. (Ji ja muut 2006)

0.1 % DMSO 10 μ M MPA 100 μ M guanosiini MPA+guanosiini

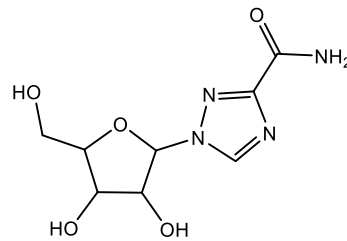


Kuva 4. A) Värjäytyneet IMPDH2 entsyymit 786-O-soluissa eri käsittelyjen jälkeen (0,1 % DMSO, 10 μ M MPA, 100 μ M guanosiini, MPA + guanosiini). Tutkimuksessa käytetty primäärinen vasta-aine oli kanissa tuotettu anti-IMPDH2 ja sekundäärinen vasta-aine oli vuohen vasta-aine kanin vasta-ainetta IgG AF568 vastaan. B) Mykofenolihapon (MPA) kemiallinen rakenne. Alkuperäistä kuvaa ei ole julkaistu. Kuvaa käytetään luvalla (Ryo Kamara) pohjautuen henkilökohtaiseen kommunikointiin.

Toinen lääkekehitystä vaikeuttava tekijä on MPA:n fenolinen happi, joka glukuronidoituu helposti ja muodostaa epäaktiivisen glukuronidin, joka poistuu nopeasti kohdesolusta ja elimistöstä munuaisten kautta. Tämän vuoksi seerumin MPA-pitoisuus laskee nopeasti ja vaikeuttaa MPA:n soveltamista tehokkaana syöpälääkkeenä (Naffouje ja muut 2019). Useilla syöpäsoluilla on havaittu normaalia suurempi kyky glukuronidaatioon (Hedstrom 2009). MPA:n fenolisen hapen glukuronidaatiota on pyritty estämään lisäämällä siihen erilaisia substituentteja ja muita kemiallisia modifikaatioita, mutta nämä muutokset MPA:n rakenteessa ovat vain heikentäneet voimakkaasti MPA:n IMPDH:ta inhiboivaa vaikutusta. MPA:n on havaittu olevan jopa 4,8 kertaa selektiivisempi tyypin 2 entsyymille, joka on vallitseva muoto syöpäsoluissa. (Carr ja muut 1993; Naffouje ja muut 2019; Shu ja Nair 2008)

MPA:n inhibition mekanismia on tutkittu paljon hyödyntäen esimerkiksi molekyyylimallinnusta. MPA sitoutuu E-XMP* välituotteeseen muodostaen E-XMP*•MPA kompleksin, jossa MPA kasautuu puriinirengasta vasten samalla tavalla kuin NAD⁺:an nikotiiniamidirengas (Sintchak ja muut 1996). E-XMP*•MPA kompleksin muodostuminen tekee MPA:sta ei-kilpailevan reversiibelin inhibiittorin sekä IMP:lle että NAD⁺:lle (Hupe ja muut 1986), ja MPA:n inhiboiva vaikutus kasvaa lähtöaineiden kertyessä soluun. MPA:n inhibition mekanismi on toimiessaan hyvin voimakas ja selektiivinen. MPA:n affiniteetti on kuitenkin lääkinnällisiin tarkoituksiin puutteellinen, sillä MPA:n vaikuttavan pitoisuuden tulisi olla pienempi. (Hedstrom 2009)

Ribaviriini (1- β -D-ribofuranosyyli-1,2,4-triatsoli-3-karboksamidi) on guanosiininukleotidin rakenteellinen analogi, joka fosforyloidaan solun sisällä aktiiviseksi ribaviriini-5-monofosfaatiksi (kuva 5) (Streeter ja muut 1973). Ribaviriini-5-monofosfaatti inhiboi IMPDH:n puriininukleotidien biosynteesin ensimmäistä vaihetta, jossa XMP muutetaan IMP:ksi, indusoiden antitumoraalisia vaikutuksia. Ribaviriini vaikutusmekanismia ei täysin tunneta, mutta ilmeisesti ribaviriini tunnistetaan solussa IMP:n tai GMP:n prekursoriksi, estäen IMPDH:n katalysoiman biosynteesin ensimmäisen vaiheen etenemisen (Streeter ja muut 1973). Ribaviriinin on havaittu myös kiihdyttävän joidenkin solusyklin kannalta tärkeiden proteiinien fosforylaatiota, pysäyttävän solusykliä ja lisäävän sekä endo- että eksogeenisen apoptoosin aktivoitumista (Ochiai ja muut 2018). Ribaviriini vaikuttaa myös inhiboimalla erityistä eukaryootista translaation aloitustekijää ja histonimetyylitransferaasia, mitkä saavat aikaan antitumoraalisia vaikutuksia useimmissa syöpäkudoksissa. (Naffouje ja muut 2019)



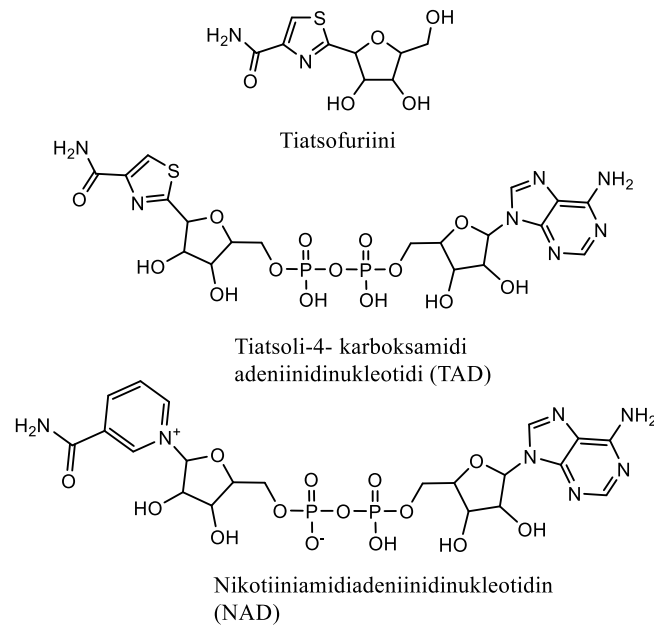
Ribaviriini

Kuva 5. Ribaviriinin (1- β -D-ribofuranosyyli-1,2,4-triatsoli-3-karboksamidi) kemiallinen rakenne.

Tiatsofuriini (kuva 6) on rakenteellisesti hyvin samankaltainen kuin ribaviriini ja sillä on inhiboiva vaikutus useisiin ihmisen syöpäsolulinjoihin, kuten paksusuolensyöpään, melanoomaan, rintasyöpään ja munasarjasyöpään. Tiatsofuriini aiheuttaa puutetta guaniininukleotideista inhiboiden IMPDH:n katalysoimaa biosynteesiä ja siten estää solujen jakautumista. (Naffouje ja muut 2019)

Tiatsofuriini vaatii metabolisen muuntumisen solun sisällä aktiiviseksi metaboliitiksi tiatsoli-4-karboksamidadeniininukleotidiksi (engl. *thiazole-4-carboxamide adenine dinucleotide*, TAD), joka tapahtuu kahdessa peräkkäisessä vaiheessa. Ensimmäisessä vaiheessa tiatsofuriini muutetaan tiatsofuriini-5'-monofosfaatiksi adenosiinikinaasin katalysoimassa reaktiossa. Toisessa vaiheessa tiatsofuriini-5'-monofosfaatti muutetaan aktiiviseksi metaboliitiksi tiatsoli-4-karboksamidadeniininukleotidiksi nikotiiniamidimononukleotidiadenyyylitransferaasin (engl. *nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase*, NMNAT) katalysoimassa reaktiossa.

Rakenteeltaan TAD on NAD^+ :n rakenteellinen analogi, jossa nikotiiniamidi on korvattu tiatsoli-4-karboksamidilla (kuva 6). TAD jäljittelee NAD^+ :aa sekä rakenteellisesti että toiminnallisesti sitoutuen NAD^+ :n sitoutumiskohtaan IMPDH:n katalyysissä keskuksessa toimien ei-kilpailevana inhibiittorina. Lääkekehityksen näkökulmasta TAD:in hyvin samanlainen rakenne NAD^+ :n kanssa on haaste, sillä ihmisellä on paljon muitakin NAD-riippuvaisia entsyymejä, joiden toimintaa TAD voi häiritä. TAD on myös metabolisesti hyvin epästabiili ja hajoaa nikotiiniamidimononukleotidiadenyyliitransferaasin vaikutuksesta.



Kuva 6. Ribaviriinin, tiatsoli-4-karboksamidadieniininukleotidin (TAD) ja nikotiiniamidiadeniininukleotidin (NAD) kemiallinen rakenne.

Tiatsofuriini on osoittautunut potentiaalisesti syöpälääkkeeksi, mutta sen menestymistä kliinisissä kokeissa on rajoittanut sen lyhyt vaikutusaika ja osa haitallisista sivuvaikutuksista, kuten neurotoksisuus ja pleuroperikardiitti (Naffouje ja muut 2019). Lisäksi joidenkin syöpäsolumenien on havaittu kehittävän resistenssiä tiatsofuriinia kohtaan, jos lääkeainetta on annettu kasvavia annoksia yli kolmen kuukauden ajan (Jayaram 1985). Resistenssin kehittymistä edistää tiatsofuriinin epäspesifisyys ja huono affiniteetti. Resistenssin kehittyminen syöpäsoluja vastaan on haitallista lääkeaineen vaikuttavuuden kannalta. Resistenssin kehittyminen saattaa olla seurausta tiatsofuriinin omasta metaboliasta solun sisällä, jossa se muutetaan TAD:ksi. Jokaisella resistenssin kehittäneellä solulla havaittiin muun muassa NAD-pyrofosfataasin määrän pieneneminen. Puolestaan TADaasin aktiivisuus oli noussut joissakin resistenssin kehittäneissä kasvainsoluissa (Jayaram ja muut 1993).

4.3 Muita lääkekandidaateiksi soveltuvia IMPDH:n inhibiittoreita

Tiatsofuriinin ei toivotut ominaisuudet ovat edistäneet korvaavien lääkeaineiden tutkimusta, missä yhdistyisi sekä tiatsofuriinin rakenne, että vaikuttavan aineen toiminta NAD^+ :n rakenteellisenä analogina. Nämä inhibiittorit ovat pääasiassa uusia ja vasta pre-kliinisessä tutkimuksessa, jotka ovat osoittaneet, että useimmilla näistä inhibiittoreista on havaittu syöpäsolujen jakautumista estäviä vaikutuksia sekä antitumoraalisia vaikutuksia. Kirjallisuuskatsauksessa esiteltäviä tiatsofuriinista johdettuja IMPDH:n inhibiittoreita ovat selenatsofuriini ja tiofenfuriini.

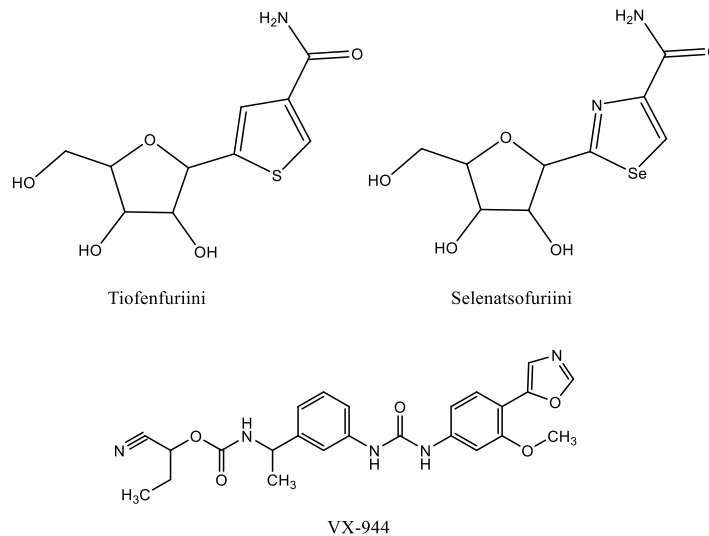
Ensimmäisiä tiatsofuriinista johdettuja IMPDH:n inhibiittoreita on selenatsofuriini (2- β -D-ribofuranosyyლისelenatsoli4-karboksamidi) (kuva 7), joka on tiatsofuriinin seleenianalogi ja muuttuu solun sisällä metaboliaprosessien kautta aktiiviseksi selenatsoli-4-karboksamidadieniinidinukleotidiksi (engl. *selenazole-4-carboxamide adenine dinucleotide*, SAD) NMNAT entsyymien katalysoimassa reaktiossa (Streeter ja Robins 1983). Solussa SAD toimii NAD^+ :n rakenteellisenä analogina inhiboiden IMPDH:n toimintaa estäen NAD^+ :n kiinnittymisen entsyymien katalyyttiseen alayksikköön (Streeter ja Robins 1983). Selenatsofuriinin on havaittu in vitro tutkimuksissa olevan potentiaalisempi syöpälääke kuin tiatsofuriini (Streeter ja Robins 1983). Lisäksi selenatsofuriinilla on havaittu laaja antiviraalinen vaikutus ja se toimii synergisesti ribaviriinin kanssa. (Naffouje ja muut 2019)

Toinen tiatsofuriinin analogi on tiofenfuriini (5- β -D-ribofuranosyylitiofeeni-3-karboksamidi) (kuva 7), joka muuttuu solun sisällä metaboliaprosessien kautta aktiiviseksi tiofeeni-3-karboksamidadieniinidinukleotidiksi (engl. *thiophene-3-carboxamide adenine dinucleotide*, TFAD). TFAD on NAD^+ :n rakenteellinen analogi, joka inhiboi IMPDH:n toimintaa. Pre-kliinisen vaiheen in vitro tutkimukset ovat osoittaneet, että tiofenfuriinilla on sytotoksisia vaikutuksia useisiin syöpäsolulinjoihin yhtä suurilla pitoisuuksilla kuin tiatsofuriinilla. (Naffouje ja muut 2019)

Uudenlainen IMPDH:n inhibiittori on VX-944 (kuva 7) on hyvin selektiivinen ja ei-kilpaileva inhibiittori ihmisen IMPDH:n molemmille tyypeille (Ishitsuka ja muut 2005). VX-944 indusoi kaspasi riippumatonta apoptoosia, joka johtaa solujen elinkyvyn heikkenemiseen (Ishitsuka ja muut 2005). VX-944 on aktiivinen tullessaan soluun eikä se siten tarvitse solunsisäistä aktivaatiota. Tämän uskotaan estävän syöpäsolujen resistenssin kehittymistä lääkeainetta kohtaan, jolloin lääkeainetta voitaisiin käyttää yhtäjaksoisesti pitkiäkin aikoja. Lisäksi VX-944 ei ole nukleotidianalogi, joten se ei vuorovaikuta DNA:n tai RNA:n kanssa. VX-944:n uskotaan toimivan synergisesti muiden syöpälääkkeiden kanssa, jotka aktivoivat kaspasi riippuvaista apoptoosia, mutta tutkimus on vielä keskeneräistä eikä tarkempaa mekanismia ole selvitetty (Ishitsuka ja muut 2005).

Prekliinisissä tutkimuksissa VX-944:n on havaittu olevan vaikuttavampi lääkeaine syövänhoidossa kuin MPA:n, sillä VX-944 on estänyt solujen kasvua tehokkaammin. Esimerkiksi akuutin myeloidisen leukemian hoidossa hiirimalleilla VX-944 oli noin 3-40 kertaa tehokkaampi kuin MPA ja VX-944 hoidon jälkeen hiirien eloonjääminen oli todennäköisempää kuin niillä, jotka olivat hoidettu tällä hetkellä käytössä olevilla syöpälääkkeillä. Lisäksi VX-944:n on havaittu estävän moninkertaisesti myelooman, paksusuolensyövän, rintasyövän, keuhkosityövän, haimasyövän, eturauhassyövän ja melanooman solulinjojen. (Naffouje ja muut 2019)

Faasin I kliinisissä tutkimuksissa terveet koehenkilöt ovat kestäneet VX-944 lääkkeen vaikutuksia hyvin. Myöhemmin lääkettä on testattu koehenkilöillä, joilla oli pitkälle edennyt hematologinen syöpä. Koehenkilöt kestivät lääkkeen vaikutuksia hyvin eikä vakavia sivuvaikutuksia ilmentynyt ja joillakin potilailla havaittiin taudin pysyminen vakaana kahden kuukauden ajan. Kliinisissä kokeissa havaittiin GTP-pitoisuuden ja IMPDH:n aktiivisuuden aleneminen solussa ja tulokset korreloivat hyvin kliinisen vasteen kanssa. Tutkimukset VX-944 suhteen keskeytettiin heti faasin II kokeiden alkamisen jälkeen eikä keskeytyksen syy ole yleisesti tiedossa. (Naffouje ja muut 2019)



Kuva 7. Tiolfenuriinin, selenatsofuriinin ja VX-944 inhibiittorien kemialliset rakenteet.

Myös flavonoideja on tutkittu IMPDH:n inhibiittoreina. Myriketiini (3,5,7-trihydroksi-2(3,4,5-trihydroksifenyyli)4-kromenoni) on muun muassa marjoissa, teessä ja vihanneksissa esiintyvä flavonoidi. Myriketiinin on havaittu pysäyttävän solusykliä ja aiheuttavan apoptoosia lukuisten mekanismien välityksellä, kuten estämällä tuumorigeenisten kinaasien toimintaa (Naffouje ja muut 2019). Tuumorigeenisten kinaasien toiminnan estämisen on havaittu lisäävän mitokondrioiden sisäisiä apoptoottisia reittejä, reaktiivisia happilajeja ja IMPDH:n toiminnan inhibitiota. Myriketiiniä syöpälääkkeenä on tutkittu erityisesti leukemiassa ja sillä on havaittu olevan inhiboiva vaikutus K562-solulinjaan (Pan ja muut 2016). Lisäksi myriketiinin on havaittu olevan sytotoksinen useille muille ihmisen syöpäsolulinjoille, joita esiintyy esimerkiksi paksusuolensyövässä, munasarjasyövässä, eturauhassyövässä, rintasyövässä ja kilpirauhassyövässä (Naffouje ja muut 2019). Myriketiinin vaikutukset eri syöpäsolulinjoille tapahtuvat eri mekanismien välityksellä.

Edellä esiteltyjen tyyppin 1 ja 2 IMPDH inhibiittoreiden lisäksi tiedetään lukuisia muita IMPDH:n inhibiittoreita, jotka voisivat olla potentiaalisia syöpälääkekehityksen kannalta. Esimerkiksi monilla diterpeniestereillä on havaittu syöpäsolujen jakautumista estäviä ja sytotoksisia vaikutuksia (Naffouje ja muut 2019). Vaikka IMPDH:n inhibiittorit ovat olleet monilta ominaisuuksiltaan lupaavia syöpälääkkeitä, ei niitä käytetä lääkaineina syövän hoidossa. Suurimpia ongelmia näillä syöpälääkkeillä on ollut haitalliset sivuvaikutukset suurilla annoksilla, vaihtelevat vasteet potilaissa ja resistenssin kehittyminen, jos lääkeannoksia tulee antaa useita kertoja peräkkäin. (Naffouje ja muut 2019).

4. Johtopäätökset

IMPDH on hyvin tärkeä entsyymi syöpäsolujen energiametaboliassa, sillä se katalysoi puriini nukleotidien biosynteesin ensimmäisen vaiheen, jossa IMP muuttuu oksidatiivisessa reaktiossa XMP:ksi NAD^+ :n pelkistyessä NADH:ksi. Solussa IMPDH:n toimintaa säätelevät allosteerisesti energiamolekyylit, kuten ATP ja GTP, jotka saavat aikaan entsyymin multimerisoitumista. Tyyppin 1 entsyymillä multimerisoituminen ajaa entsyymin täysin inaktiiviseen tilaan, mutta tyyppin 2 entsyymi pystyy sietämään multimerisoitumisen vaikutuksia paremmin. Entsyymin toimintaa ja rakennetta säätelevät myös monet muut yhdisteet, kuten NAD^+ ja IMP, jotka vaikuttavat entsyymin aktiivisuuteen joko kiihdyttämällä tai hidastamalla nukleotidibiosynteesiä. Allosteerisia säätelytekijöitä on tutkittu paljon syöpähoidollisina lääkekandidaateina ja niiden on osoitettu estävän syöpäsolujen jakautumista ja edistävän apoptoosia.

IMPDH:n toimintaa inhiboivia yhdisteitä on tutkittu potentiaalisina lääkekandidaateina syövän hoidossa. Monia tehokkaita inhibiittoreita on onnistuttu kehittämään, kuten mykofenolihappo, tiatsofuriini ja VX-944, joiden on havaittu estävän syöpäsolujen jakautumista, edistävän apoptoosia ja laskevan solun GTP varastoja. GTP pitoisuuden aleneminen solussa tehostaa IMPDH:n toimintaa inhiboivien lääkeaineiden vaikutusta, koska GTP toimii usein niiden antagonistina. GTP toimii myös tärkeän energiamolekyylin, ATP:n, prekursorina eli GTP:n pitoisuuden romahtaminen solussa häiritsee myös ATP:n synteesiä edellyttäen, että GTP:n pitoisuus saadaan hyvin pieneksi solussa.

Ihmisen IMPDH:n molempien muotojen rakenteen ja toiminnan välisen yhteyden tutkimusta tulee jatkaa tulevaisuudessa, jotta allosteerisen säätelyn ja inhibition monimutkaiset mekanismit opitaan ymmärtämään paremmin. Esimerkiksi syöpäsolujen kehittämän resistenssin syntymekanismi IMPDH:n toimintaa inhiboivia lääkeaineita kohtaan on hyvin puutteellisesti tutkittu sekä uudempien IMPDH:ta inhiboivien lääkeaineiden vaikutusmekanismit tulisi selvittää tarkemmin. Myös eri syöpälääkkeiden käyttö samanaikaisesti ja niiden mahdolliset synergiset vaikutukset vaativat lisätutkimusta, sillä tällöin potilaan hoitovaste voisi olla parempi kuin käytettäessä vain yhtä lääkeainetta.

Tulevaisuudessa myös entsyymien toimintaa inhiboivien yhteisteiden rakenteiden muokkaamisen merkitys korostuu, jotta lääkeaineista voidaan tehdä yhä spesifisempiä kohteelleen. Lääkkeiden spesifisyyden kasvaessa, myös resistenssin kehittymisen todennäköisyys alenee. Toinen tärkeä tavoite lääkeaineiden rakenteen muokkauksella olisi saada niistä vähemmän toksisia ihmiselle, sillä nyt monen IMPDH:n toimintaa inhiboivan syöpälääkkeen käyttöä ja tutkimusta rajoittaa lääkkeen toksisuus ihmiselle ja sen aiheuttamat haitalliset sivuvaikutukset. Myös muiden käyttöä rajoittavien epäkohtien tutkimus korostuu tulevaisuudessa.

Lääkeaineiden rakenteen muokkauksessa voidaan hyödyntää jo tehokkaiksi todistettuja inhibiittoreita tai aivan uusia molekyylijä. Tällä hetkellä tutkimus on keskittynyt nukleotidien sitoutumiskohtiin ja muihin tärkeisiin alueisiin allosteerisen säätelyn kannalta. Tulevaisuudessa saattavat korostua myös uudet entsyymien rakenteelliset alueet, joita aiemmin ei ole tutkittu IMPDH:n aktiivisuusmuutoksiin liittyen. Aikaisemmin on tutkittu lähinnä vain tyypin 2 entsyymiä potentiaalisena lääkekehityksen kohteena, mutta tulevaisuudessa tyypin 1 tutkimuksen merkitys tulee varmasti yhä tärkeämmäksi syöpätutkimuksen edistyessä.

Lähteet

- Bennett, B. D., Kimball, E. H., Gao, M., Osterhout, R., Van Dien, S. J. & Rabinowitz, J. D. (2009) Absolute Metabolite Concentrations and Implied Enzyme Active Site Occupancy in *Escherichia coli*. *Nat Chem Biol* **5**:593–599.
- Buey, R. M., Fernández-Justel, D., Jiménez, A. & Revuelta, J. L. (2022) The gateway to guanine nucleotides: Allosteric regulation of IMP dehydrogenases. *Protein Science* **31**:e4399.
- Buey, R. M., Ledesma-Amaro, R., Velázquez-Campoy, A., Balsera, M., Chagoyen, M., de Pereda, J. M. & Revuelta, J. L. (2015) Guanine nucleotide binding to the Bateman domain mediates the allosteric inhibition of eukaryotic IMP dehydrogenases. *Nat Commun* **6**:8923.
- Burrell, A. L. & Kollman, J. M. (2022) IMPDH dysregulation in disease: A mini review. *Biochem Soc Trans* **50**:71–82.
- Carr, S. F., Papp, E., Wu, J. C. & Natsumeda, Y. (1993) Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases. *Journal of Biological Chemistry* **268**:27286–27290.
- Duong-Ly, K. C., Kuo, Y.-M., Johnson, M. C., Cote, J. M., Kollman, J. M., Soboloff, J., ... Peterson, J. R. (2018) T cell activation triggers reversible inosine-5'-monophosphate dehydrogenase assembly. *Journal of Cell Science* jcs.223289.
- Hedstrom, L. (2009) IMP Dehydrogenase: Structure, Mechanism, and Inhibition. *Chem Rev* **109**:2903–2928.
- Hupe, D. J., Azzolina, B. A. & Behrens, N. D. (1986) IMP dehydrogenase from the intracellular parasitic protozoan *Eimeria tenella* and its inhibition by mycophenolic acid. *Journal of Biological Chemistry* **261**:8363–8369.
- Ishitsuka, K., Hideshima, T., Hamasaki, M., Raje, N., Kumar, S., Podar, K., ... Anderson, K. C. (2005) Novel inosine monophosphate dehydrogenase inhibitor VX-944 induces apoptosis in multiple myeloma cells primarily via caspase-independent AIF/Endo G pathway. *Oncogene* **24**:5888–5896.

- Jayaram, H. N. (1985) Biochemical mechanisms of resistance to tiazofurin. **1985**:67–89.
- Jayaram, H. N., Zhen, W. & Gharehbaghi, K. (1993) Biochemical Consequences of Resistance to Tiazofurin in Human Myelogenous Leukemic K562 Cells. *Cancer Research* **53**:2344–2348.
- Ji, Y., Gu, J., Makhov, A. M., Griffith, J. D. & Mitchell, B. S. (2006) Regulation of the Interaction of Inosine Monophosphate Dehydrogenase with Mycophenolic Acid by GTP*. *Journal of Biological Chemistry* **281**:206–212.
- Naffouje, R., Grover, P., Yu, H., Sendilnathan, A., Wolfe, K., Majd, N., ... Sasaki, A. T. (2019) Anti-Tumor Potential of IMP Dehydrogenase Inhibitors: A Century-Long Story. *Cancers* **11**:1346.
- Natsumeda, Y., Ohno, S., Kawasaki, H., Konno, Y., Weber, G. & Suzuki, K. (1990) Two distinct cDNAs for human IMP dehydrogenase. *The Journal of biological chemistry* **265**:5292.
- Ochiai, Y., Sano, E., Okamoto, Y., Yoshimura, S., Makita, K., Yamamuro, S., ... Katayama, Y. (2018) Efficacy of ribavirin against malignant glioma cell lines: Follow-up study. *Oncol Rep* **39**:537–544.
- Pan, H., Hu, Q., Wang, J., Liu, Z., Wu, D., Lu, W. & Huang, J. (2016) Myricetin is a novel inhibitor of human inosine 5'-monophosphate dehydrogenase with anti-leukemia activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **477**:915–922.
- Shu, Q. & Nair, V. (2008) Inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) as a target in drug discovery. *Medicinal Research Reviews* **28**:219–232.
- Sintchak, M. D., Fleming, M. A., Futer, O., Raybuck, S. A., Chambers, S. P., Caron, P. R., ... Wilson, K. P. (1996) Structure and Mechanism of Inosine Monophosphate Dehydrogenase in Complex with the Immunosuppressant Mycophenolic Acid. *Cell* **85**:921–930.
- Streeter, D. G. & Robins, R. K. (1983) Comparative invitro studies of tiazofurin and a selenazole analog. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **115**:544–550.

Streeter, D. G., Witkowski, J. T., Khare, G. P., Sidwell, R. W., Bauer, R. J., Robins, R. K. & Simon, L. N. (1973) Mechanism of Action of 1- β -D-Ribofuranosyl-1,2,4-Triazole-3-Carboxamide (Virazole), A New Broad-Spectrum Antiviral Agent. *Proc Natl Acad Sci USA* **70**:1174–1178.

Tressler, R. J., Garvin, L. J. & Slate, D. L. (1994) Anti-tumor activity of mycophenolate mofetil against human and mouse tumors in vivo. *International Journal of Cancer* **57**:568–573.