

Ludzka topoizomeraza typu II jako molekularny punkt uchwytu leków przeciwnowotworowych

Human topoisomerase II as a molecular target of anticancer drugs

STRESZCZENIE: ludzka topoizomeraza typu II stanowi punkt uchwytu naturalnych i syntetycznych związków o zróżnicowanej budowie strukturalnej. Wiele spośród tych leków wykazuje silne działanie przeciwnowotworowe. Reprezentują one jedną z najbardziej efektywnych grup chemioterapeutyków wykorzystywanych obecnie w leczeniu nowotworów piersi, jajników, prostaty, mięsaków, chłoniaków, jak również złośliwych nowotworów układu krwiotwórczego. Największą, a zarazem najważniejszą grupą chemioterapeutyków wśród inhibitorów ludzkiej topoizomerazy typu II są związki posiadające zdolność stabilizacji kompleksu rozszczepialnego DNA-topoizomeraza II, tzw. trucizny topoizomerazy II takie jak doksorubicyna, etopozyd, czy genisteina. Zrozumienie mechanizmu działania inhibitorów topoizomerazy II doprowadziło do syntezy szeregu nowych związków przeciwnowotworowych znajdujących się obecnie w wczesnych fazach badań klinicznych.

SŁOWA KLUCZOWE: leki przeciwnowotworowe, ludzka topoizomeraza typu II, inhibitory topoizomerazy II

SUMMARY: human topoisomerase II is the target of a diverse group of natural and synthetic compounds. Some of them are used for the treatment of breast cancer, prostatic cancer, sarcomas, lymphomas and hematological malignancies. The most important topoisomerase II targeting substances act by trapping the cleaved G-strand-enzyme intermediate, thus, blocking religation and enzyme release, leaving the DNA with a permanent double strand break (topoisomerase II poisons). The best known topoisomerase II-poisons belong to two classes of antineoplastic agents, the epipodophyllotoxins (e.g. etoposide and teniposide) and the anthracyclines (e.g. doxorubicin). New catalytic inhibitors of human topoisomerase II have been developed and are currently in clinical trials.

KEY WORDS: anticancer drugs, human topoisomerase type II, inhibitors of topoisomerase II

Budowa i mechanizm działania ludzkiej topoizomerazy typu II

Topoizomerazy należą do enzymów katalizujących zmiany w strukturze przestrzennej DNA poprzez udział we wszystkich procesach związanych z rozplataniem komplementarnych nici DNA. Ułatwiają one przeprowadzenie procesów, takich jak: replikacja, transkrypcja i rekombinacja. Dodatkowo są odpowiedzialne za utrzymanie struktury chromatyny. Topoizomerazy odgrywają również ważną rolę w kondensacji chromosomów i segregacji chromatyd siostrzanych. Ponadto wykazują one zdolność rozpoznawania endogennych i egzogennych zmian patologicznych DNA.

Rozpatrując budowę ludzkiej topoizomerazy typu II można wyróżnić: dwie domeny ATP-azowe, domenę rdzeniową połączoną z resztą tyrozynową oraz domenę C-kończową. Topoizomeraza II występująca u ssaków składa się z dwóch izoform: α (o masie 170 kD) i β (o masie 180 kD). Ekspresja obu tych izoform uzależniona jest od etapu cyklu komórkowego. Ekspresja topoizomerazy II α wzrasta podczas fazy S, aby osiągnąć swój szczyt w fazach G2-M, a maleje podczas fazy G1, podczas gdy ekspresja topoizomerazy II β utrzymuje się na stałym poziomie we wszystkich fazach cyklu komórkowego. W przypadku izoformy β stwierdzono, że może ona wspomagać funkcjonowanie topoizomerazy II α w sytuacji gdy jej ekspresja jest zbyt niska, bądź w przypadku gdy doszło do jej zahamowania lub mutacji. Przeprowadzone przez różnych autorów badania wykazały, że obie izoformy biorą udział w naprawie uszkodzeń DNA będących wynikiem działania leków alkilujących.



mgr

MONIKA LEPIARCZYK
Samodzielną Pracownią
Biotechnologii, Uniwersytet
Medycyny w Białymstoku

dr hab. **ANNA BIELAWSKA**
Samodzielną Pracownią
Biotechnologii, Uniwersytet
Medycyny w Białymstoku

dr **KATARZYNA SOSNOWSKA**
Zakład Farmacji Stosowanej,
Uniwersytet Medyczny
w Białymstoku

dr hab. **KRZYSZTOF BIELAWSKI**
Zakład Syntezy i Technologii Środków
Leczniczych, Uniwersytet Medyczny
w Białymstoku

Ludzka topoizomeraza typu II jest białkiem (homodimerem), które posiada zdolność przecinania obu nici DNA w miejscach znajdujących się naprzeciwko siebie, przemieszczenia przeciętych nici, a następnie ligacji wiązań fosfodiestrowych. Podczas przecięcia nici DNA dochodzi do utworzenia wiązania kowalencyjnego pomiędzy grupą hydroksylową tyrozyny, znajdującej się w centrum aktywnym enzymu, a końcem 5' przeciętej nici DNA. W ten sposób rozpoczyna

Zatwierdzono do publikacji: styczeń 2011 r.

się cykl katalityczny topoizomerazy II, który polega na wiązaniu topoizomerazy II do dwóch segmentów dwuniciowego DNA. Drugi etap to przyłączenie dwóch cząsteczek ATP i dimeryzacja domen ATP-azowych. Kolejny, trzeci etap to przecięcie jednego z segmentów DNA, a następnie przeniesienie nieprzeciętego segmentu DNA przez powstałą przerwę w pierwszym segmencie DNA, czemu towarzyszy hydroliza jednej cząsteczki ATP. W piątym etapie przecięty segment DNA zostaje połączony, a druga cząsteczka ATP ulega hydrolizie. Po odłączeniu dwóch cząsteczek ADP nieprzecięty segment DNA zostaje przetransportowany przez otwór w domenie C-końcowej topoizomerazy II (etap szósty). Następnie otwór ulega zamknięciu. Ostatni, siódmy etap to ponowne otwarcie domen ATP-azowych pozwalające na odłączenie enzymu od DNA.

Katalityczne inhibitory ludzkiej topoizomerazy typu II

Substancjami hamującymi pierwszy etap cyklu katalitycznego topoizomerazy II są: akklarubicyna i suramina. Akklarubicyna to antybiotyk antracyklinowy stosowany w leczeniu chłoniaków i ostrych białaczek mielocytowych. W porównaniu do pozostałych antybiotyków z tej grupy m.in. doksorubicyny i daunorubicyny wykazuje mniej działań niepożądanych. Akklarubicyna należy do interkalatorów DNA. Zjawisko interkalacji to niekowalencyjne oddziaływanie związku z DNA polegające na wnikaniu, najczęściej policyklicznej i aromatycznej cząsteczki związku, pomiędzy pary zasad w podwójnej helisie DNA. W wyniku interkalacji dochodzi do rozkręcenia helisy i zmniejszenia liczby superhelikalnych zwojów, co prowadzi do zmniejszenia powinowactwa enzymu do DNA. Wbudowanie interkalatora do łańcucha DNA powoduje zaburzenia w strukturze DNA poprzez zmiany: kąta skręcenia helisy, odległości między parami zasad oraz średnicy cząsteczki DNA. Łączenie się interkalatora z chromosomalnym DNA prowadzi często do jego fragmentacji. Pęknięcia DNA powstałe pod wpływem interkalatorów mogą stać się miejscem wiązania białek.

Suramina to kolejny inhibitor pierwszego etapu cyklu katalitycznego topo-

izomerazy II, który zapobiega połączeniu się enzymu z DNA, prowadząc tym samym do zahamowania katalitycznej aktywności tego enzymu. Ponadto związek ten hamuje kinazę C, polimerazę DNA i RNA. Suramina stosowana jest w leczeniu nowotworów prostaty i glejaków. Do działań niepożądanych wywołanych przez suraminę należy głównie neuropatia i limfopenia.

Inhibitorem drugiego etapu cyklu katalitycznego jest nowobiocyna, otrzymywana z hodowli grzyba *Streptomyces spheroides* lub *Streptomyces niveus*. Należy ona do antybiotyków kumarynowych, budowana jest z 3-amino-4,7-dihydroksykumarynowego rdzenia połączonego z cukrem nowiozą. Nowobiocyna hamuje topoizomerazę II ssaków i gyrazę B poprzez blokowanie miejsca wiążącego ATP.

Inhibitorem trzeciego etapu cyklu katalitycznego topoizomerazy II jest merbaron wiążący się specyficznie do topoizomerazy II α . Prowadzi to do unieczynnienia tego enzymu i uniemożliwia powstanie kompleksu rozszczepialnego. Przeprowadzone badania cyklu katalitycznego topoizomerazy II wykazały, że merbaron nie wpływa na wiązanie enzymu z DNA ani na hydrolizę ATP. Związek ten konkuruje z etopozydem o to samo miejsce wiązania z topoizomerazą II.

Największą, a zarazem najważniejszą grupą chemioterapeutyków wśród inhibitorów ludzkiej topoizomerazy typu II są związki hamujące czwarty etap cyklu katalitycznego, zwane truciznami topoizomerazy II. Posiadają one zdolność stabilizacji kompleksu rozszczepialnego DNA-topoizomeraza II. Wśród nich występują interkalatory oraz substancje o właściwościach nieinterkalujących. Do trucizn ludzkiej topoizomerazy II o właściwościach interkalujących należą amsakryna i jej modyfikacje: o-AMSA i m-AMSA, które wiążą się niekowalencyjnie z kompleksem rozszczepialnym. Oba związki jednakowo wbudowują się pomiędzy łańcuchy DNA, jednak tylko m-AMSA wykazuje działanie przeciwnowotworowe. Fragmentacja DNA w obecności m-AMSA jest podobna do pęknięć powstałych przy udziale topoizomerazy II. Prawdopodobnym mechanizmem działania interkalatorów DNA

wydaje się być stabilizacja kompleksu rozszczepialnego i uniemożliwienie procesu ligacji przeciętych przez topoizomerazę łańcuchów DNA.

Pochodne antracykliny – doksorubicyna i daunorubicyna – są truciznami ludzkiej topoizomerazy II, które wiążą się w sposób kowalencyjny z kompleksem rozszczepialnym oraz posiadają zdolność do interkalacji. Doksorubicyna (adriamycyna) została wyizolowana ze *Streptococcus peucetius vario cassius*. Aglikon doksorubicyny posiada zdolność interkalacji, natomiast reszta cukru bierze udział w powstawaniu i stabilizacji kompleksu doksorubicyna-DNA-topoizomeraza II. Zdolność doksorubicyny do utworzenia trzyczęściowych kompleksów z topoizomerazą II i DNA hamuje ponowne połączenie przeciętych nici DNA, co prowadzi do apoptozy komórki. Doksorubicyna to chemioterapeutyk o szerokim spektrum działania wykazujący aktywność wobec nowotworu płuc, tarczycy i jajnika, jak również w chorobie Hodgkina. Ponadto jest stosowana w leczeniu chłoniaków złośliwych (w skojarzeniu z cyklofosfamidem), mięsaków: kościotwórczego, Ewinga i tkanek miękkich, wykazuje także skuteczność w raku piersi. Jej zastosowanie w lecznictwie jest ograniczone ze względu na kardiotoksyczność i rozwój oporności wielolekowej.

Do trucizn ludzkiej topoizomerazy typu II, które nie posiadają właściwości interkalujących należą: pochodne epipodofilotoksyny oraz izoflawnonoidy. Etopozyd (Etoposide, Lastet, Vepesid) jest półsyntetyczną pochodną epipodofilotoksyny. Wykazuje selektywność w stosunku do izoformy α topoizomerazy II i wiąże się kowalencyjnie z kompleksem DNA-topoizomeraza II α . Wykorzystywany jest w leczeniu nowotworów centralnego układu nerwowego, nowotworów jąder i złośliwych chłoniaków. Najnowsze badania wskazują, że etopozyd hamuje wzrost komórek za pośrednictwem androgenu/AR oraz syntezę DNA stymulowaną androgenem w komórkach nowotworowych prostaty. Nowym analogiem epipodofilotoksyny jest 4 β -{[4-(pirolidyno-1-ylometylo)fenylo]amino}-4'-O-demetylo-4-epipodofilotoksyna. Związek ten należy do trucizn topoizo-

merazy II. Podobnie jak etopozyd w sposób kowalencyjny wiąże się z tym kompleksem oraz może indukować dwuniciowe przerwy w DNA. Charakteryzuje się on wyższą aktywnością przeciwnowotworową w porównaniu z etopozydem w hodowlach komórkowych różnych typów nowotworów. Jest on skuteczny zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro* w stosunku do komórek wykazujących oporność wielolekową.

Genisteina jest izoflawonoidem otrzymywanym z nasion soi. Mechanizm działania genisteiny polega na wiązaniu się w sposób niekowalencyjny z kompleksem rozszczepialnym DNA-topoizomeraza II. Jej chemoprewencyjne właściwości wykorzystywane są głównie w przypadku nowotworów hormonozależnych takich jak: rak piersi i prostaty. Różnicowaniu komórek nowotworowych poddanych działaniu genisteiny towarzyszy zmniejszenie wzrostu komórek i obniżenie aktywności topoizomerazy II.

Do trucizn ludzkiej topoizomerazy II należą też alkaloidy benzofenandrynowe oraz ich syntetyczna pochodna – związek NK314. Związek ten tworzy kompleks z topoizomerazą II i wywołuje dwuniciowe przerwy w chromosomalnym DNA. Do zbadania specyficzności NK314 wobec izoform topoizomerazy II zostały użyte ludzkie linie komórkowe nowotworu szyjki macicy HeLaS3 i białaczki limfocytowej Nalm-6. Badania wykazały, że za cytotoksyczność związku NK314 odpowiedzialna jest izoforma α .

Do inhibitorów czwartego etapu (trucizn topoizomerazy II) należy też mitoksantron, który budową przypomina antybiotyki antracyklinowe, ale posiada mniejszą od nich kardiotoxyczność. Wykorzystywany jest w leczeniu nowotworów piersi, jajników i pęcherza moczowego. Ponadto związek ten znalazł także zastosowanie w leczeniu zaawansowanego, wtórnie postępującego stwardnienia rozsianego.

Nie wyodrębniono jeszcze związków będących inhibitorami piątego etapu cyklu katalitycznego. Inhibitorami szóstego etapu cyklu katalitycznego topoizomerazy II są pochodne bisdioksopiperazyny. Deksrazoksan (ICRF-187) to cykliczny analog kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA) będący jednocze-

śnie S(+)-enancjomerem razoksanu (ICRF-159). Katalityczna inhibicja topoizomerazy przy udziale ICRF-187 może prowadzić do indukcji apoptozy. Proces taki zaobserwowano w komórkach białaczki ludzkiej linii: CEM i K562. Głównym zastosowaniem klinicznym ICRF-187 jest obniżenie kardiotoxyczności towarzyszącej chemioterapii nowotworów prowadzonej z użyciem antracyklin. Ponadto jest stosowany łącznie z mitoksantronem w leczeniu skojarzonym stwardnienia rozsianego. Kolejną pochodną bisdioksopiperazyny jest ICRF-193. Przeprowadzone badania wykazały, że spośród wszystkich analogów zaliczanych do tej grupy związek ICRF-193 najsilniej hamuje topoizomerażę II. Zaobserwowano również, że jego działanie jest dziesięć razy silniejsze w stosunku do izoformy α niż β . Zarówno ICRF-187 i ICRF-193 posiadają miejsca wiążące topoizomerażę w obrębie domeny N-końcowej i domeny rdzeniowej. Mechanizm działania pochodnych bisdioksopiperazyny polega na stabilizacji kompleksu DNA-enzym poprzez niekowalencyjne oddziaływanie tych związków z enzymem przed połączeniem z DNA, co prowadzi do zahamowania aktywności ATP-azowej enzymu.

Katalityczne inhibitory ludzkiej topoizomerazy II o mieszanym mechanizmie działania

Do katalitycznych inhibitorów topoizomerazy II o nie do końca ustalonym mechanizmie działania zaliczamy nowe zsintetyzowane chinolony, których przykładem jest związek oznaczony symbolem Cp-115,953. Chinolony są to jedyne leki, które wykazują wysoką aktywność zarówno wobec eukariotycznej, jak i prokariotycznej topoizomerazy II. Do wspomnianej grupy związków należy także 3,3'-diindolometan. Związek ten posiada złożony mechanizm działania: hamuje izoformę α oraz częściowo izoformę β topoizomerazy II. Nie posiada on jednak zdolności do stabilizacji kompleksu rozszczepialnego DNA z topoizomerażą II. Kolejnym związkiem należącym do katalitycznych inhibitorów o nie do końca ustalonym mechanizmie działania jest simocyklinon D8 (SD8). Mechanizm jego działania polega na bezpośrednim bloko-

waniu wiązania się topoizomerazy II do DNA, bez indukowania przerw w nici DNA, nawet przy wysokich dawkach. W badaniu Sadiq i wsp. sprawdzali aktywność samego SD8 oraz w połączeniu z cisplatyną wobec komórek złośliwego międzybłoniaka MM i komórek nowotworu płuc NSCLC. Wykazano, że związek SD8 hamuje wzrost komórek NSCLC i MM poprzez indukcję apoptozy. W przypadku terapii skojarzonej z etopozydem potwierdzono, że związek SD8 warunkuje szybką i silną indukcję apoptozy.

Zaobserwowano również, że benzo-chinon można zaliczyć do grupy silnych inhibitorów topoizomerazy II. Jest to związek addycyjny, który wiąże się kowalencyjnie z enzymem. Benzochinon podczas inkubacji z kompleksem DNA-topoizomeraza II zachowuje się jak trucizna topoizomerazy II, natomiast w przypadku braku DNA hamuje inne etapy cyklu katalitycznego topoizomerazy II. Związane jest to prawdopodobnie ze zdolnością benzochinonu do tworzenia wiązania krzyżowego z domeną N-końcową topoizomerazy II. Badania potwierdzają zdolność benzochinonu do hamowania izoformy α topoizomerazy II. Przeprowadzono także kilka doświadczeń, w których wykazano słabą zdolność benzochinonu do hamowania izoformy β topoizomerazy II.

Kolejny związek wpływający na aktywność topoizomerazy II to berenil. Jest to silny inhibitor ludzkiej topoizomerazy II, posiadający także zdolność do rozpoznawania i wbudowywania się w sekwencje DNA bogate w pary zasad AT. Otrzymane niedawno berenilowe pochodne platyny wykazują oprócz zdolności alkilujących DNA także zdolność hamowania topoizomerazy II przy dwukrotnie niższym stężeniu niż berenil. Trwają badania nad poznaniem dokładnego mechanizmu warunkującego aktywność przeciwnowotworową tych związków. Prowadzone w wielu ośrodkach naukowych badania dowodzą, że topoizomerazy typu II mogą być efektywnym punktem uchwytu dla nowych leków przeciwnowotworowych.

Wykaz piśmiennictwa u autorów

Adres do korespondencji:
dr hab. **Anna Bielawska**
aniabel@umw.edu.pl