

ZAVIRALCI DNA TOPOIZOMERAZE II α - POMEMBNE TARČE PROTIRAKAVIH UČINKOVIN

INHIBITORS OF DNA TOPOISOMERASE II α – AN IMPORTANT TARGET OF ANTICANCER THERAPY

AVTOR / AUTHOR:

dr. Barbara Pogorelčnik, uni. dipl. inž.
kem. tehnol.

Matej Janežič

doc. dr. Andrej Perdih, mag. farm.

*Kemijski inštitut, Hajdrihova 19, 1001 Ljubljana,
Slovenija*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: andrej.perdih@ki.si

1 UVOD

1.1 RAZDELITEV IN FUNKCIJA DRUŽINE ENCIMOV TOPOIZOMERAZ

DNA topoizomeraze (topoizomeraze) sodijo v veliko skupino encimov, ki spreminjajo topološko obliko DNA. V grobem jih razdelimo v dve skupini: tip I in tip II. Prve cepijo eno verigo v dvoverižni DNA, druge pa cepijo obe verigi (1, 2). Glede na organizem, mehanizem cepitve in aminokislinsko zaporedje obstaja še podrobnejša delitev na posamezne družine (preglednica 1).

POVZETEK

DNA-topoizomeraze sodijo v družino encimov, ki katalizirajo topološke spremembe v molekuli DNA. Med njimi je tudi DNA topoizomeraza II α , znana in dobro validirana tarča več protirakavih učinkovin, ki jih uporabljamo za zdravljenje raka dojk, pljuč in prostate, sarkoma ter hematoloških oblik raka. Učinkovine, ki zavirajo aktivnost topoizomeraze II α , razdelimo glede na mehanizem delovanja v skupini topoizomeraznih strupov in katalitičnih zaviralcev. Topoizomerazni strupi stabilizirajo kovalentni kompleks med DNA in topoizomerazo II α in tako spremenijo encim v močan celični toksin, ki onemogoča normalno delitev celic. Kar nekaj učinkovin iz te skupine pogosto uporabljamo v klinični praksi, a je zaradi neželenih učinkov, predvsem kardiotoksičnosti, nujen nadaljnji razvoj zaviralcev tega encima. V novejšo skupino sodijo inhibitorji posameznih korakov katalitičnega cikla DNA topoizomeraze II α . V prispevku predstavljamo to pomembno tarčo protirakavih učinkovin in nekatere novosti na področju razvoja zaviralcev v obeh razredih.

KLJUČNE BESEDE:

*topoizomeraza II α , katalitični zaviralci,
topoizomerazni strupi*

ABSTRACT

DNA topoisomerases are a group

an important anticancer target and highlight some of the advances made in the development of topoisomerase IIa inhibitors.

KEY WORDS:
topoisomerase IIa, catalytic inhibitors, topoisomerase poisons

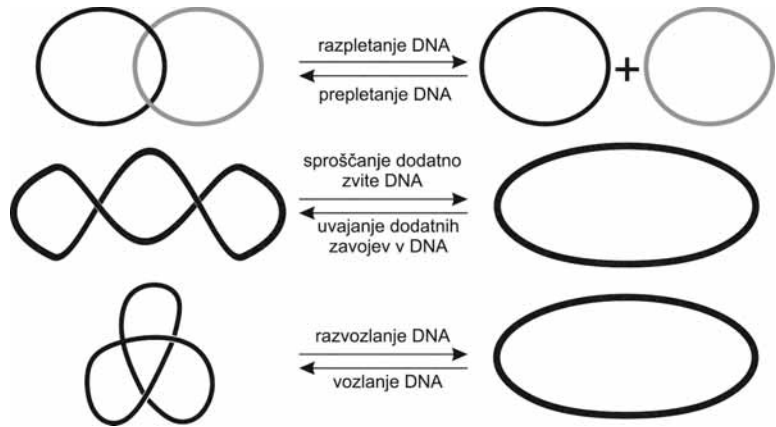
Človeška topoizomeraza IIA se nahaja v dveh izooblikah: α in β . Encima imata ločen genski zapis (70-odstotno uje-manje aminokislinskega zaporedja) in se razlikujeta v veli-

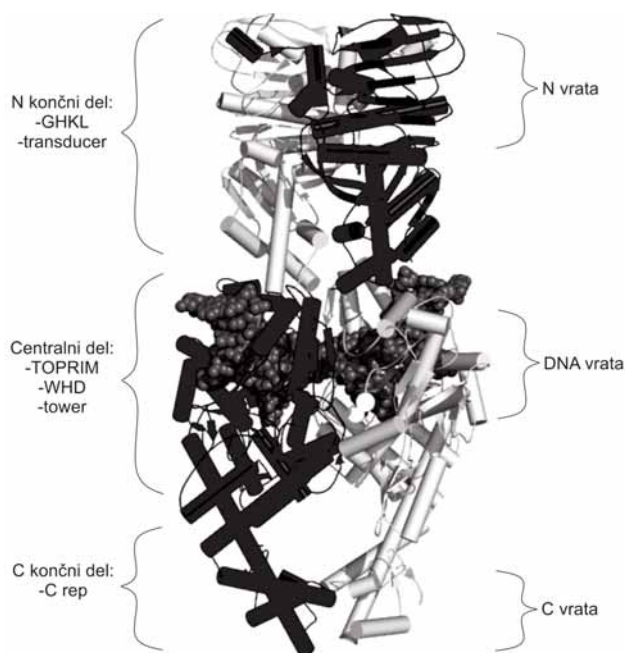
kosti, afiniteti do različnih topoloških oblik DNA in izražanju v celicah. Alfa oblika je najbolj izražena v hitro delečih se tkivih, beta oblika pa je izražena bolj sistemsko. Njuna kon-centracija se spreminja tudi med potekom celičnega cikla; največja je v delečih se celicah, beta izooblika topoizome-raze II prevladuje v nedelečih in pomitotičnih celicah (4, 5). Na sliki 1 so shematsko predstavljene topološke spre-membe, ki jih v DNA uvajajo topoizomeraze tipa II, ki so osrednja tema tega prispevka.

Topoizomeraze tipa II so preko tvorbe kovalentnega kom-pleksa z DNA sposobne sproščati dodatne zavoje, razple-

Preglednica 1: Razdelitev znanih topoizomeraz (3)
Table 1: Classification of known topoisomerases (3)

Družina	Ime topoizomeraze	Izolirano iz:
IA	Bakterijska DNA topoizomeraza I	<i>Escherichia coli</i>
	Bakterijska DNA topoizomeraza III	<i>Escherichia coli</i>
	Kvasovkina DNA topoizomeraza III	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	Človeška DNA topoizomeraza IIIa	<i>Homo sapiens</i>
	Človeška DNA topoizomeraza IIIβ	<i>Homo sapiens</i>
	Bakterijska in arhejska reverzna DNA giraza	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>
IB	Bakterijska reverzna DNA giraza	<i>Methanopyrus kandleri</i>
	Evkarionska DNA topoizomeraza I	<i>Homo sapiens</i>
	Poksivirusna topoizomeraza	<i>Vaccinia</i>
IC	Bakterijska DNA topoizomeraza V	<i>Methanopyrus kandleri</i>
	Arhejska DNA topoizomeraza V	<i>Methanopyrus kandleri</i>
IIA	Bakterijska DNA giraza	<i>Escherichia coli</i>
	Bakterijska DNA topoizomeraza IV	<i>Escherichia coli</i>
	Kvasovkina DNA topoizomeraza II	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	Človeška DNA topoizomeraza IIa	<i>Homo sapiens</i>
	Človeška DNA topoizomeraza IIβ	<i>Homo sapiens</i>
IIB	Arhejska DNA topoizomeraza VI	<i>Sulfolobus shibatae</i>
	Rastlinska DNA topoizomeraza VI	<i>Arabidopsis thaliana</i>





Slika 2: Kristalna struktura kvasovkine topoizomeraze tipa II, ki je strukturno podobna človeški topoizomerazi II α , v kompleksu z dvoveržno DNA (koda strukture, deponirane v bazi Protein Data Bank (PDB): 4GFH) (7). DNA (kroglični model) je obarvana sivo, en protomer črno in drugi protomer belo. Na sliki so označene tudi posamezne proteinske enote in njihovi deli ter dimerizacijske podenote (glejte mehanizem delovanja).

Figure 2: Crystal structure of the whole yeast topoisomerase II, which is structurally similar to the human topoisomerase II α , in complex with DNA (PDB structure: 4GFH) (7). DNA (spheres) is depicted in grey, one protomer is shown in black and the other one in white. Individual protein subunits and their parts, as well as dimerization units (see mechanism of action) are also marked.

tanja in razvozlanja, kar je nujno za nemoten potek celične delitve in prepisovanja. Na tem mestu naj omenimo, da je bakterijska topoizomeraza, DNA-giraza, edinstvena v svoji sposobnosti glede na ostale predstavnike družine, da v DNA lahko uvaja tudi negativne zavoje (6).

1.2 STRUKTURA TOPOIZOMERAZE II α

Tridimenzionalna struktura celotne človeške topoizomeraze II α še ni znana, lahko pa na podlagi posameznih izkristaliziranih delov in homologije z drugimi topoizomerazami tipa II sklepamo o prostorski urejenosti proteina. V ta namen je posebej uporabna kvasovkina topoizomeraza II, za katero so uspeli določiti celotno strukturo v kompleksu z DNA (slika 2) (7). Protein je homodimer in vsak protomer je razdeljen na tri enote: N-končno, centralno in C-končno. N-

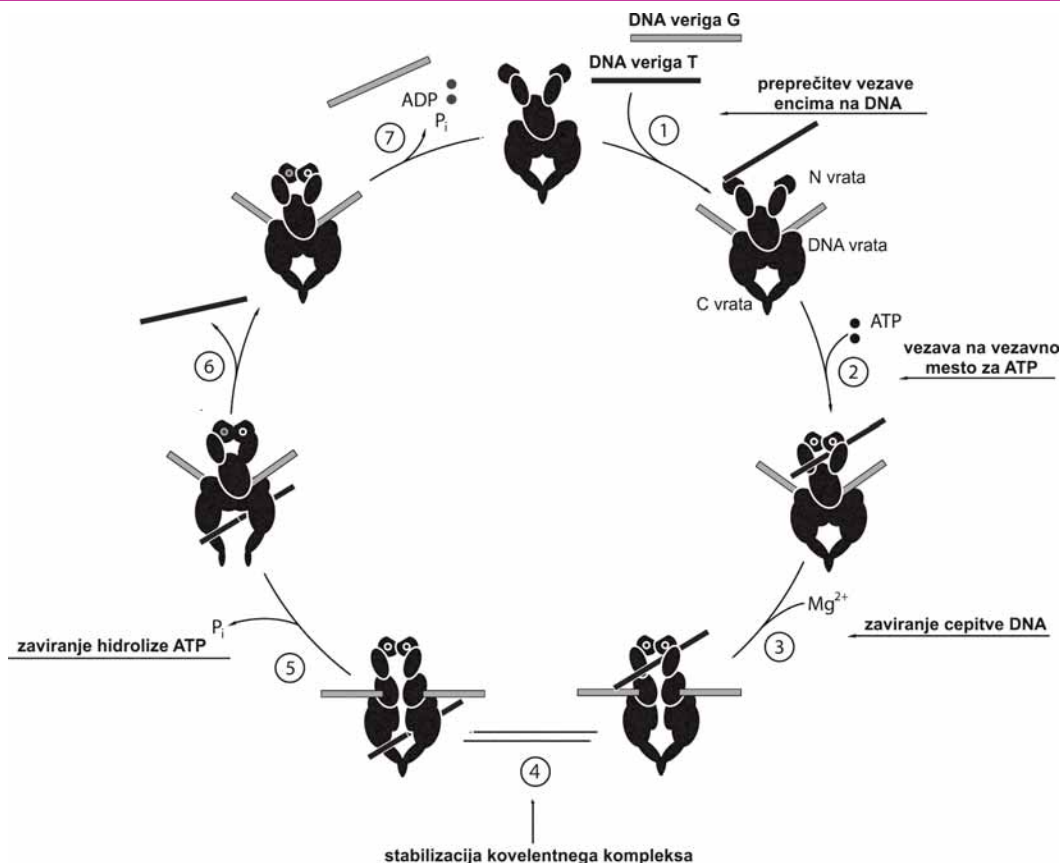
končni del, ki ga imenujemo tudi ATPazna domena, je sestavljen iz ATP-vezavnega mesta iz družine encimov GHKL (giraza, Hsp90, histidin-kinaza in MutL protein), in t. i. *transducer* domene. Centralna enota vsebuje tri domene: TOPRIM (Topoisomerase/Primase), WHD (*winged helix domain*) in tower domeno. C-končni del pa vsebuje C-rep (8, 9).

2 MEHANIZEM DELOVANJA TOPOIZOMERAZE II α

Topoizomeraze II α delujejo preko zapletenega večstopenjskega mehanizma, pri katerem encim preko nadzorovane asociacije in disociacije dimerizacijskih podenot (t. i. vrat) cepi in usmerja premikanje molekul DNA, tako da pride do prehoda ene verige skozi drugo. Topoizomeraza II α ima v ta namen tri take podenote. N-vrata vključujejo GHKL- in ATP-vezavno mesto, pod DNA vrata sodita domeni TOPRIM ter WHD, C-vrata pa tvori konec C-repa (1

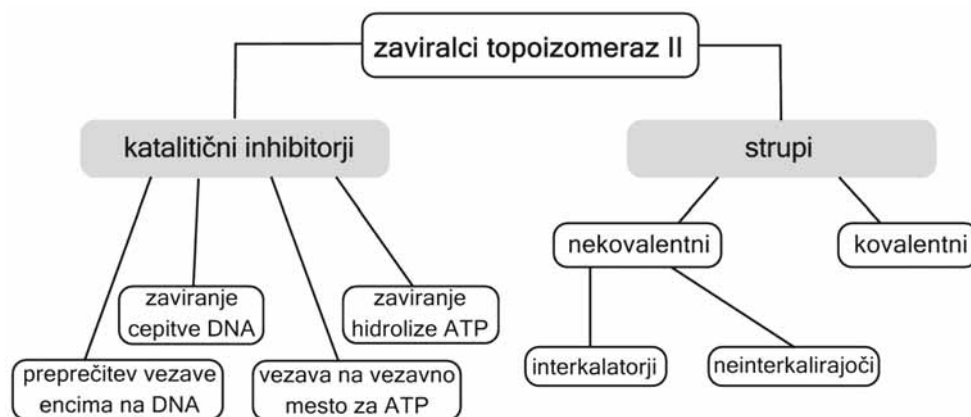
čne inhibitorje, ki zavirajo številne korake katalitičnega cikla, in t. i. strupe, ki po vezavi encim spremenijo v močan celični toksin (od tod tudi ime strupi) (slika 4). Prvi so starejši

in že dobro uveljavljeni, drugi pa so novejši in še le na začetku svoje farmakoterapijske poti (1, 2).



Slika 3: Shema mehanizma delovanja topoizomeraze IIA z označenimi mesti, kjer delujejo znani inhibitorji (11)

Figure 3: Schematic representation of the topoisomerase IIA catalytic cycle. The known possible inhibition steps are also noted (11).



Slika 4: Ena izmed razdelitev učinkovin, ki delujejo na človeško DNA topoizomerazo II

Figure 4: One possible classification of human DNA topoisomerase II inhibitors

3.1 TOPOIZOMERAZNI STRUPI

Pri normalni rasti celic je kovalentni kompleks, ki se tvori med DNA in encimom pri cepitvi verige DNA (slika 3, korak 3), kratkoživ in njegova prisotnost skorajda nezaznavna. V ravnotežju je namreč religacija DNA bolj favorizirana kot pa njena cepitev. Topoizomerazni strupi stabilizirajo ta kovalentni kompleks (slika 3, korak 4) in encim spremenijo v celični toksin. Posledično pride do trajnih prekinitev DNA, kar povzroči kromosomske premestitve in celično smrt. Slika 5 shematsko predstavlja delovanje strupov.

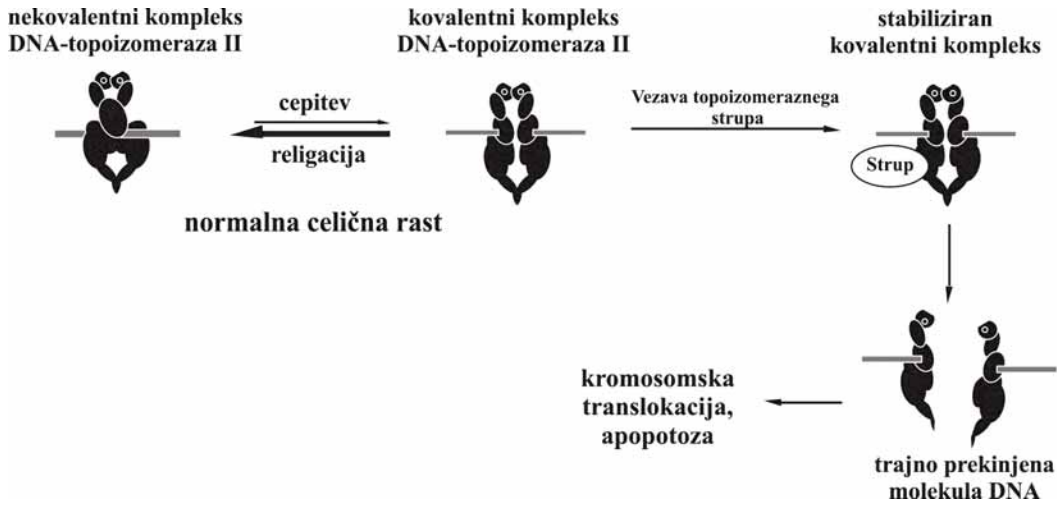
Topoizomerazne strupe delimo na kovalentne in nekovalentne, slednje pa nadalje na interkalatorje in neinterkalirajoče spojine (1, 2). V preglednici 2 so zbrane učinkovine, ki

jih uporabljamo v Sloveniji (13), in na sliki 6 so prikazane strukture izbranih topoizomeraznih strupov.

3.1.1 Nekovalentni topoizomerazni strupi

Neinterkalirajoče učinkovine iz skupine nekovalentnih topoizomeraznih strupov se vežejo na sam encim in s tem ovirajo njegovo delovanje, interkalatorji pa se vrivajo med bazne pare molekul DNA in na ta način otežujejo religacijo (2).

Eden najbolj znanih neinterkalirajočih učinkovin je etopozid (1), polsintezni derivat podofilotoksina, nealkaloidnega lignana iz različnih vrst podofilov (*Podophyllum* sp.) (14). Indikacije za njegovo uporabo so drobno-in nedrobnocelični



Slika 5: Mehanizem delovanja topoizomeraznih strupov. Vezava strupa stabilizira kovalentni kompleks DNA topoizomeraza, kar vodi do trajnih prekinitev v molekuli DNA in posledično poškodb v celici (2).

Figure 5: Mechanism of action of topoisomerase II poisons. Binding of a DNA poison stabilizes the DNA topoisomerase covalent complex, which leads to permanent double-strand breaks and, consequently, cell damage (2).

Preglednica 2: Topoizomerazni strupi, ki jih uporabljamo v Sloveniji

Table 2: Topoisomerase poisons in use in Slovenia

Učinkovina	Indikacije	Mehanizem
etopozid (1)	rak testisov, rak pljuč, limfom, akutna mielotična levkemija (otroci in odrasli), horiokarcinom	neinterkalirajoči strup
doksorubicin (2)	levkemija, limfom, sarkom	interkalator
epirubicin (3)	sarkom mehkih tkiv, levkemija, hormonsko neodvisni rak prostate	interkalator
idarubicin (4)	akutna nelimfoblastna levkemija (odrasli), akutna limf	

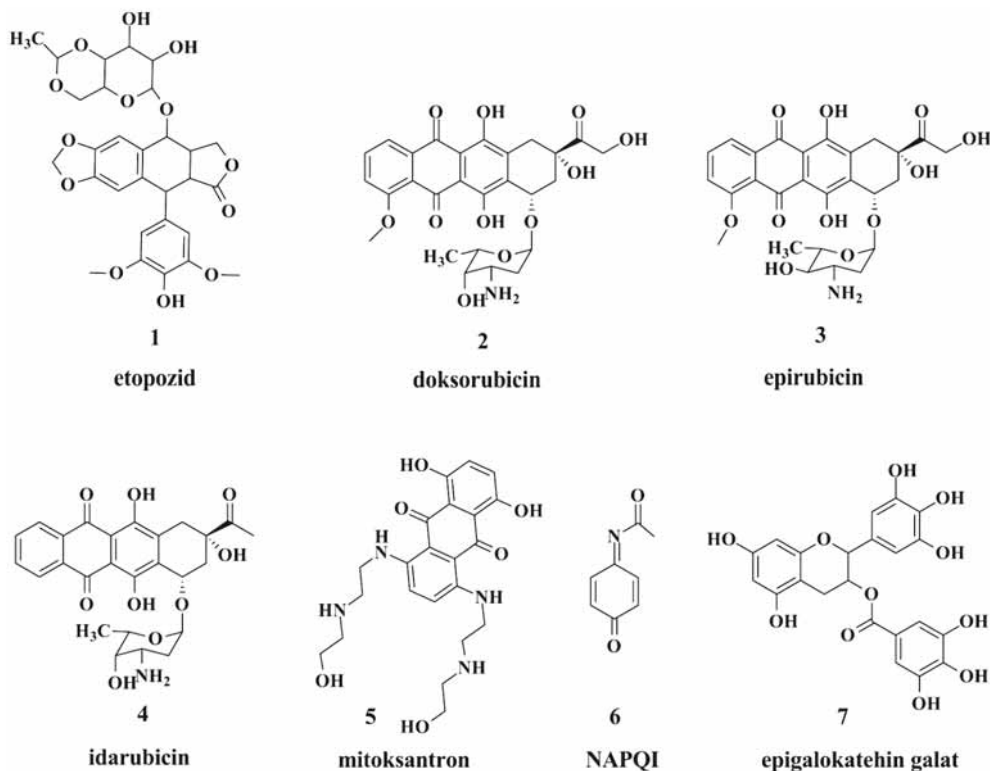
pljučni rak, neseminomatozni rak testisov, akutna mielocitna levkemija (pri otrocih in odraslih), Hodgkinov in ne-Hodgkinov limfom ter horiokarcinom. Njegovo delovanje je fazno specifično: deleče se celice zaustavi v fazi S in zgodnji fazi G2 celičnega cikla. V želji po izboljšanju farmakoloških lastnosti (predvsem slabe vodotopnosti), so pripravili predzdravilo etopozid fosfat; prosto OH skupino so zaestriili s fosforjevo(V) kislino (15).

Najbolj znani interkalatorji so antraciklini doksorubicin (2) in daunorubicin ter njuni analogi, epirubicin (3) (stereoizomer doksorubicina), idarubicin (4) in pirarubicin. Antraciklini vsebujejo tetraciklični sistem s kinonskim jedrom in pripetim sladkorjem, daunozaminom. Planarna struktura jim omogoča vrvanje med bazne pare, hkrati pa pride še do dodatnih poškodb DNA, ker je osrednji obroč reaktiven in se tvorijo radikali (16). Doksorubicin (2) uporabljamo pri zdravljenju raka bezgavk, endometrija, pljuč, mehurja, želodca, ščitnice, prostate, trebušne slinavke, levkemijah, sarkomom, pri Hodgkinovem in ne-Hodgkinovem limfomu, Wilmsonovem tumorju ter rakavih boleznih neznanega izvora. Indikacije za epirubicin (3) so limfomi, sarkomi mehkih tkiv, raki želodca, pljuč, jajčnikov in hormonsko neodvisni

raki prostate. Idarubicin (4) je namenjen zdravljenju akutne nelimfoblastne levkemije pri odraslih in je zdravilo drugega izbora za akutne limfoblastne levkemije pri odraslih ter otrocih. Zaradi odstranitve metoksi skupine s tetraciklinskega obroča je bolj lipofilen in bolje prodira v celice (16, 17). Z mitoksantronom (5), antraciklinskim analogom z antraklonskim skeletom, zdravimo akutno nelimfocitno levkemijo, napredovan rak dojke, hepatocelularni rak in ne-Hodgkinov limfom. To učinkovino uporabljamo tudi za zdravljenje multiple skleroze (17, 18).

3.1.2 Kovalentni topoizomerazni strupi

Te spojine se preko redoks reakcij kovalentno vežejo na encim in poškodujejo celice. Njihovo delovanje je v prisotnosti reducentov zmanjšano. Sem sodijo tako kinonski metaboliti kot bioflavonoidi, na tržišču pa še ni protirakovih zdravil, ki bi delovale po tem mehanizmu (2). Znan predstavnik kinonov je spojina 6, NAPQI (N-acetil-*p*-benzokinon imin), metabolit paracetamola, ki nastaja v velikih količinah pri prekomernem odmerkih le-tega in močno poškoduje jetra (19). Med bioflavonoide sodijo številne polifenolne spojine, ki so del vsakodnevne prehrane in delujejo kemo-protektivno. Eden izmed predstavnikov je spojina 7, epi-



galokatehingalat, ki je najpogostejši polifenol v zelenem čaju. Opozoriti velja, da nosečnicam odsvetujemo uživanje z bioflavonoidi bogate hrane, ker se s tem lahko poveča tveganje za razvoj levkemije pri otroku (20).

3.2 KATALITIČNI INHIBITORJI – NOVA IN OBETAVNA SKUPINA ZAVIRALCEV DNA TOPOIZOMERAZE II α

Zaradi neželenih učinkov strupov, predvsem karditoksičnosti pri molekulah iz skupine interkalatorjev ter pojava akutne mielogene anemije pri neinterkalirajočih strupih (21), se raziskave na tem področju usmerjajo v nadaljnji razvoj in optimizacijo učinkovin, ki bi zavirale topoizomerozo II α . Katalitični inhibitorji so obetavna in raznovrstna skupina spojin, ki lahko zavirajo številne korake prej opisanega katalitičnega cikla (slika 3); preprečijo lahko vezavo encima na DNA, tekmujejo za vezavo z ATP ter zavirajo cepitev DNA ali pa hidrolizo ATP. Na sliki 7 so prikazane strukture izbranih topoizomernih katalitičnih inhibitorjev.

Aklarubicin (**8**) je antraciklin, ki indirektno zavira topoizomerozo II α ; veže se na DNA in s tem onemogoči dostop encimu do substrata (slika 3, katalitični korak 1). Dokazali so tudi, da stabilizira kovalentni kompleks pri topoizomerazi I, torej je tudi topoizomerni I strup (22, 23). Indiciran je pri zdravljenju levkemije (24) in limfoma (25). Merbaron (**9**), tiobarbituratni analog, prepreči cepitev verige DNA (slika 3, katalitični korak 3), ne da bi vplival na vezavo encima na DNA. Začetni *in vitro* rezultati so bili obetavni, a druge faze

kliničnih testiranj ni preстал zaradi premajhne antitumorne aktivnosti in težav z nefrotoksičnostjo (11). Deksrazoksan (**10**) je edini katalitični inhibitor v klinični uporabi v Sloveniji (13). Deluje tako, da zavira hidrolizo ATP (slika 3, katalitični korak 5) in s tem prepreči začetek novega katalitičnega cikla. Uporabljamo ga kot kardioprotektiv pri zdravljenju z antraciklini (26). Učinkovin, ki bi se vezale na ATP-vezavno mesto topoizomerase II α , še ni na tržišču, toda na tem prijemališču v zadnjih letih intenzivno potekajo raziskave (1). Predstavniki tega razreda so derivati pirazolopirimidina (**11**) (27), triazina (**12**) (28) in triazinona (**13**) (29) ter spojina naravnega izvora, gambojska kislina **14**, ki so jo izolirali iz drevesa *Garcinia hurburyi* (30). Te učinkovine preprečijo vezavo molekule ATP (slika 3, katalitični korak 2) in tako zaustavijo kaskado konformacijskih sprememb, ki vodijo do cepitve molekule DNA (1).

4 SKLEP

Rakave bolezni, ki predstavljajo enega izmed najpogostejših vzrokov smrti, so težka ter obremenjujo

Mnoga mesta v katalitičnem ciklu topoizomeraz še niso dobro izkoriščena kot prijemališča učinkovin, tako da ostaja še veliko potenciala za razvoj novih, do pacienta prijaznejših zdravil. Nedavno objavljene kristalne strukture in mehanistične raziskave bodo gotovo v veliko pomoč pri optimizaciji obstoječih učinkovin ter pri načrtovanju in odkrivanju novih molekul, predvsem iz skupine katalitičnih inhibitorjev, ki so šele na začetku svoje farmakoterapijske poti.

5 LITERATURA

- Pogorelčnik B, Perdih A, Solmajer T. Recent Advances in the Development of Catalytic Inhibitors of Human DNA Topoisomerase II alpha As Novel Anticancer Agents. *Curr Med Chem* 2013; 20: 694–709.
- Pogorelčnik B, Perdih A and Solmajer T. Recent Developments of DNA Poisons - Human DNA Topoisomerase II alpha Inhibitors - as Anticancer Agents. *Curr Pharm Des* 2013; 19: 2474–2488.
- Champoux JJ. DNA topoisomerases: Structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 369–413.
- Fortune JM, Osheroff N. Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: When enzymes stop being nice. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Vol 64 2000; 64: 221–253.
- McClendon AK, Rodriguez AC, Osheroff N. Human topoisomerase II alpha rapidly relaxes positively supercoiled DNA - Implications for enzyme action ahead of replication forks. *J Biol Chem* 2005; 280: 39337–39345.
- Pommier Y, Leo E, Zhang HL, Marchand C. DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. *Chem Biol* 2010; 17: 421–433.
- Schmidt BH, Osheroff N, Berger JM. Structure of a topoisomerase II-DNA-nucleotide complex reveals a new control mechanism for ATPase activity. *Nat Struct Mol Biol* 2012; 19: 1147–1154.
- Berger JM. Type II DNA topoisomerases. *Curr Opin Struct Biol* 1998; 8: 26–32.
- Berger JM, Gamblin SJ, Harrison SC et al. Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature* 1996; 379: 225–232.
- Wendorff TJ, Schmidt BH, Heslop P et al. The Structure of DNA-Bound Human Topoisomerase II Alpha: Conformational Mechanisms for Coordinating Inter-Subunit Interactions with DNA Cleavage. *J Mol Biol* 2012.
- Larsen AK, Esegueil AE, Skladanowski A. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 2003; 99: 167–181.
- Bates AD, Berger JM, Maxwell A. The ancestral role of ATP hydrolysis in type II topoisomerases: prevention of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: 6327–6339.
- Centralna baza zdravil.
<http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search?SearchView&Query=%28%5BJENALISTI%5D=1%29&SearchOrder=4>. Dostop: 16-02-2015.
- Lin HW, Kwok KH, Doran PM. Production of podophyllotoxin using cross-species coculture of *Linum flavum* hairy roots and *Podophyllum hexandrum* cell suspensions. *Biotechnol Progr* 2003; 19: 1417–1426.
- Hande KR. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer* 1998; 34: 1514–1521.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E et al. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 185–229.
- Dal Ben D, Palumbo M, Zagotto G et al. DNA topoisomerase II structures and anthracycline activity: Insights into ternary complex formation. *Curr Pharm Des* 2007; 13: 2766–2780.
- Faulds D, Balfour JA, Chrisp P et al. Mitoxantrone - a Review of Its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Potential in the Chemotherapy of Cancer. *Drugs* 1991; 41: 400–449.
- Bender RP, Lindsey