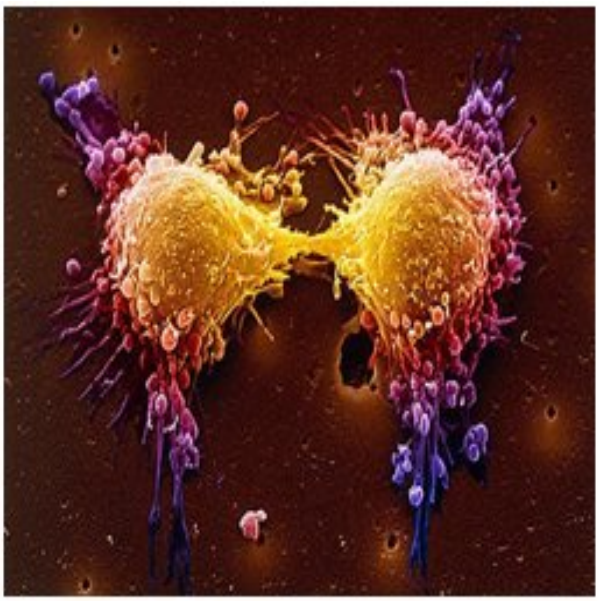
Akceptuję
W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej Polityce Prywatności

Cykl komórkowy a powodzenie terapii przeciwnowotworowej



Wstęp

Nowotwór często jest nazywany „chorobą cyklu komórkowego” ponieważ jedną z podstawowych cech komórek nowotworowych jest niekontrolowana proliferacja. Cykl komórkowy reguluje system tzw. punktów kontrolnych. Ich zadaniem jest warunkowanie rozpoczęcia kolejnej fazy cyklu komórkowego oraz monitorowanie prawidłowego przebiegu zdarzeń, jakie zachodzą w jego poszczególnych fazach. Zaobserwowano, że u większości komórek nowotworowych występują zmiany w mechanizmach regulujących progresję cyklu komórkowego. Poznanie funkcjonowania punktów kontrolnych cyklu komórkowego było przełomem w zrozumieniu zachowania się komórek nowotworowych, a także reakcji tych komórek na leki. Mechanizmy regulacji punktów kontrolnych mogą stać się celem dla nowych, bardziej selektywnych terapii przeciwnowotworowych [1].

Cykl komórkowy

Cykl komórkowy jest to szereg zmian biochemicznych oraz biofizycznych komórki, prowadzący do powstania dwóch komórek potomnych, zawierających taką samą informację genetyczną jak komórka macierzysta. Składa się on z interfazy, czyli okresu pomiędzy podziałami, oraz samego podziału, czyli mitozy. W interfazie dochodzi do podwojenia materiału genetycznego, natomiast w czasie mitozy podwojony materiał genetyczny jest rozdzielany w równych częściach do dwóch komórek potomnych. W interfazie cyklu komórkowego wyróżnia się fazę G1, S oraz G2. W pierwszej fazie G1, następuje wejście komórki w następny etap replikacyjny i rozpoczęcie syntezy DNA. W fazie S, syntezy DNA, dochodzi do replikacji genomu i podwojenia wszystkich składników komórki. W kolejnej fazie G2, zachodzi możliwość naprawy uszkodzeń DNA, powstałych we wcześniejszych fazach cyklu. Uszkodzenia DNA muszą zostać usunięte zanim komórka wejdzie w ostatnią fazę - mitozę, w której dochodzi do podziału zawartości komórki i wytworzenia dwóch komórek potomnych [1].

Za prawidłowy przebieg zdarzeń w kolejnych etapach cyklu i funkcjonowania w każdej z wymienionych faz cyklu komórkowego odpowiadają punkty kontrolne. Udowodniono, że ich działanie w komórkach nowotworowych jest nierzadko zaburzone bądź zmienione. Większość komórek nowotworowych posiada nieaktywny punkt kontrolny w fazie G1, w którym dochodzi do podjęcia decyzji o wejściu w następną fazę podziałową. Komórki nowotworowe charakteryzują się także nieprawidłowościami w funkcjonowaniu punktów kontrolnych w fazie G2 i M. Zmiany w działaniu mechanizmów kontrolnych regulujących progresję cyklu komórkowego, przyczyniają się

do stałej proliferacji komórek nowotworowych, jak również jej niezależności od czynników wzrostu i czynników mitogennych [1].

Regulacja cyklu komórkowego

Regulacja cyklu komórkowego polega na oddziaływaniu na komórkę, w odpowiednim czasie, czynników pobudzających i hamujących. Kompleksy białkowe regulują wchodzenie komórek w kolejne fazy cyklu komórkowego. Kompleksy te składają się z cyklin pełniących rolę podjednostek regulacyjnych, kinaz cyklinozależnych (cdk - ang. cyclin-dependent kinase) oraz podjednostki katalitycznej. Rodzaj kinazy i cykliny, decyduje o możliwości formowania różnych typów kompleksów mających zdolność aktywacji wielu białek, odpowiadających za przejście między fazami cyklu komórkowego. Za przejście z fazy G1 do S odpowiedzialność biorą kompleksy cyklina D/Cdk4, cyklina D/Cdk6 i cyklina E/Cdk2. Kompleks cyklina A/Cdk2 reguluje przejście przez fazę S i wejście do fazy G2. Natomiast za przejście z fazy G2 oraz wejście w mitozę odpowiada kompleks cyklina B1/Cdk1. W celu uzyskania pełnej aktywności kompleksu konieczne jest związanie się ze sobą właściwej cykliny i kinazy cyklinozależnej, a także usunięcie grup fosforanowych z cdk, hamujących aktywność kinazową tego białka. W czasie cyklu komórkowego poziom kinaz cyklinozależnychnie zmienia się, natomiast wewnątrzkomórkowa zawartość cyklin jest regulowana na poziomie ekspresji oraz stabilności białek i jest zharmonizowana z przechodzeniem przez kolejne fazy cyklu komórkowego. Odpowiednia cyklina, pojawia się i znika we właściwym czasie. Z tego powodu progresja przez poszczególne fazy cyklu komórkowego jest procesem jednokierunkowym i nieodwracalnym [2].

Za monitorowanie prawidłowości przebiegu procesów komórkowych, mających związek z przechodzeniem przez kolejne fazy cyklu komórkowego, odpowiedzialność biorą mechanizmy funkcjonujące w komórkach. Są nimi punkty kontrolne, które stają się aktywne w momencie pojawienia się zaburzenia bądź błędu, stanowiącego zagrożenie dla prawidłowego funkcjonowania komórki. Celem punktów kontrolnych jest hamowanie progresji cyklu komórkowego, co daje komórce czas niezbędny do usunięcia nieprawidłowości, a w przypadku skuteczności tego działania, kontynuacje cyklu komórkowego. Dwa główne punkty kontrolne sprawdzają przejście z faz G1 do S i G2 do M cyklu komórkowego. Najważniejszą rolę odgrywa punkt kontrolny G1, nazywany „start”, gdyż jego przejście determinuje komórkę do ukończenia pełnego cyklu [2].

- **Punkt kontrolny fazy G1**

W prawidłowo dzielących się komórkach, właściwy przebieg cyklu komórkowego kontrolowany jest w punktach kontrolnych, znajdujących się na granicy fazy G1 i fazy S, a także pod koniec fazy G2. Zasadniczą funkcję w regulacji punktu kontrolującego przejście między fazą G1 i S pełnią białko retinoblastoma pRbi białko supresorowe nowotworu P53. Rola białka Rb polega na transdukcji sygnału łączącego układ kontroli cyklu komórkowego z transkrypcją. Białko to również pośredniczy w kontroli ekspresji genów nieodzownych w fazie S. Ponadto jest ono głównym punktem kontroli integrującym sygnał, który regulują podziały komórkowe. Funkcjonowanie szlaku regulowanego przez białko pRb posiada istotne znaczenie i jest nie zależne od obecności stresu genotoksycznego. Natomiast mechanizm regulowany przez białko supresoroweP53 uruchamiany jest wyłącznie w obecności uszkodzeń DNA. Jednakże oba te szlaki, jeżeli są aktywne, odpowiadają za zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 [1].

W punkcie kontrolnym G1/S replikacja DNA ulega wstrzymaniu, a następnie białko p53 aktywuje mechanizm apoptozy. Aby komórka mogła wejść w fazę S cyklu, konieczna jest obecność kinazy zależnej od cyklin CDK2 i cykliny E. Kompleksy cyklina D/Cdk4,6 i cyklina E/Cdk2, aktywowane

w pierwszych etapach cyklu komórkowego, powodują fosforylację licznych białek komórkowych, w tym także białka pRb. Ufosforylowane białko pRb uwalnia czynnik transkrypcyjny E2F, który jest wiązany przez białko pRb, w związku z czym czynnik E2F nie posiada zdolności do wiązania się z DNA. Uwolnienie aktywnego czynnika E2F doprowadza do jego związania się z rejonami promotorowymi genów, co pozwala na syntezę białek odpowiedzialnych za wejście komórek w fazę S [2].

W drugim szlaku, odpowiedzialnym za kontrolę i naprawę uszkodzeń DNA, białko P53 ulega fosforylacji przez kinazy białkowe ATM lub ATR. Fosforylacja białka P53 prowadzi do utraty jego zdolności do wiązania się z białkiem regulującym jego rozpad, białkiem MDM2. Modyfikacja ta jest konieczna do zwiększenia stabilności białka P53 oraz jego poziomu w komórce. Białko P53 działa także jako czynnik transkrypcyjny regulując ekspresję dużej grupy białek, między innymi aktywuje transkrypcję białka p27 i p21, będącego inhibitorem kinaz białkowych zależnych od cyklin. Białka P21 oraz P27 wiążą się z kompleksami cyklina D/cdk4,6 oraz cyklina E/cdk2 i hamują ich aktywność. Nieaktywne kompleksy cyklina-Cdk uniemożliwiają wprowadzenie komórki do fazy S. Zatrzymanie cyklu daje komórce czas na naprawę DNA [2,3].

Za prawidłowe funkcjonowanie punktu kontrolnego faz G1 i S odpowiedzialne jest także białko P16, które również jest inhibitorem kompleksu cyklina D/Cdk4,6. Do jego indukcji dochodzi w wyniku pojawienia się uszkodzeń DNA, błędów replikacji bądź zaburzeń w strukturze telomerowych odcinków DNA. Ze względna na to, że kompleksy cyklina D/Cdk4,6 i cyklina E/Cdk2 regulują wyjście z fazy G1 i wejście w fazę S, zahamowanie ich aktywności powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 [2,3].

- **Punkt kontrolny fazy S**

Zidentyfikowano także punkt kontrolny fazy S cyklu komórkowego, którego aktywność zależy od dwóch kinaz białkowych, ATM i ATR. Kinaza białkowa ATM odpowiada na uszkodzenia podwójnej nici DNA oraz przerwania struktury chromatyny, natomiast ATR bierze odpowiedzialność za zatrzymanie widełek replikacyjnych. Punkt kontrolny fazy Sjest aktywowany w każdej sytuacji, która zakłóca ruch tych widełek, na przykład prowadzi do ich zatrzymania w miejscu, w którym znajduje się uszkodzenie DNA. Ponadto punkt kontrolny fazy S jest aktywowany w momencie pojawienia się błędów w działaniu enzymów odpowiedzialnych za replikacje DNA. Powoduje on zatrzymanie procesu replikacji DNA i naprawę powstałych uszkodzeń. Punkt kontrolny fazy S jest niezbędny w celu zapewnienia prawidłowej replikacji komórkowego DNA, w przypadku nieobecności stresu zewnętrznego [4].

W skład kompleksu replikacyjnego wchodzą białka, mogące wykryć oraz sygnalizować pojawienie się błędów podczas replikacji. Do białek sygnalizacyjnych, takich jak kinaza ATR i Chk1, są przekazywane informacje o błędach. W odpowiedzi białka te fosforylują grupę białek regulatorowych oraz efektorowych, odpowiedzialnych za wstrzymanie procesu replikacji w danym miejscu oraz powstrzymanie jej wystąpienia w innych miejscach. Aktywność białek Chk1 i ATR służy także reperacji uszkodzeń, jak również wznowieniu replikacji po usunięciu uszkodzeń [2,5].

Do aktywacji kinazy ATR dochodzi wówczas, gdy przyłącza się ona wraz z białkiem regulatorowym ATRIP, do białka replikacyjnego A. Aktywowana kinaza ATR, wraz z innymi białkami biorącymi udział w regulacji punktu kontrolnego fazy S, fosforyluje białko Chk1 i aktywuje jego domenę kinazową, a następnie Chk1fosforyluje inne białka. Najistotniejszymi substratami kinazy Chk1 są fosfatazy tyrozynowe Cdc25A oraz Cdc25C. Pełnią one istotną rolę w regulacji punktów kontrolnych odpowiednio na granicy faz G1 i S, a także G2 oraz M. W wyniku fosforylacji białek Cdc25/A/C

następuje ich degradacja przez kompleks proteasomu. Skutkuje to brakiem możliwości wejścia komórek w fazę syntezy S i wejścia komórek do mitozy. Blokowanie cyklu komórkowego na tych etapach utrzymuje się dotąd, dopóki w komórce będzie aktywny mechanizm punktu kontrolnego fazy S [2,5].

- **Punkty kontrolne fazy G2**

Faza G2 obejmuje okres od zakończenia replikacji do rozpoczęcia mitozy.Za przejście z fazy G2 do mitozy jest odpowiedzialny aktywny kompleks kinazy Cdk1 z podjednostką regulatorową -cykliną B1. Kompleks ten pozostaje w formie nieaktywnej katalitycznie, poprzez fosforylację reszt treoniny 14 i tyrozyny 15, a także białka regulujące funkcjonowanie punktu kontrolnego w fazie G2. Aktywację tego punktu kontrolnego, powodują uszkodzenia DNA, stąd też nazywany jest on punktem kontrolnym uszkodzeń DNA (ang. DNA damage checkpoint). Punkt kontrolny fazy G2 spełnia istotną rolę w funkcjonowaniu komórki, ponieważ zabezpiecza ją przed przekazywaniem komórkom potomnym uszkodzonego genomu oraz zmian genetycznych, mogących stwarzać zagrożenie dla prawidłowego funkcjonowania, czy też życia komórki [2,6].

Mechanizm aktywowany w fazie G2 na skutek uszkodzeń DNA polega na aktywacji kinazy ATM i wykazującej podobieństwo do niej kinazy ATR. Kinazy te są głównym elementem mechanizmu molekularnego, który prowadzi do zatrzymania proliferacji oraz naprawy DNA w fazie G2. Aktywowane kinazy ATM i ATR prowadzą do fosforylacji Chk1 oraz spokrewnionej kinazy Chk2, które pełnią funkcję białek sygnalizacyjnych [2,6]. Istotnym substratem kinazy Chk1 jest fosfataza Cdc25C, która wskutek fosforylacji seryny 216 wiąże się z białkiem 14-3-3σ i formuje kompleks transportowany z jądra komórkowego do cytoplazmy. Skutkuje to spadkiem poziomu Cdc25C w jądrze, co uniemożliwia defosforylację kompleksu kinazy Cdk1 z cykliną B i związaną z tym aktywację kompleksu. Nie jest więc możliwe wejście komórek do mitozy [2,7].

Zatrzymanie przejścia komórki z fazy G2 do mitozy jest możliwe przez zablokowanie transportu kompleksu cyklina B/Cdk1 do jądra. Transport ten może być zablokowany przez wiązanie kompleksu z białkiem 14-3-3σ bądź zahamowanie dezaktywacji aktywnej kinazy mitotycznej Cdk1przez wiązanie z inhibitorem kinaz zależnych od cykliny lub białkiem P21 (CDKN1A). BiałkaP21 i 14-3-3σodgrywają istotną rolę w regulacji przejścia G2 w obecności uszkodzeń DNA. Komórki mające wyłączone geny kodujące P21 i 14-3-3σsą bardziej wrażliwe na czynniki uszkadzające DNA aniżeli komórki, w których każdy z tych genów jest inaktywowany oddzielnie [2,7].

Punkt kontrolny późnej fazy G2 odpowiada za przejście komórki z fazy G2 do mitozy. Podział komórki zostaje zatrzymany w fazie G2 dopóki naprawa DNA nie zostanie zakończona. Podstawową rolę spełnia tu białko p21, które dezaktywuje kompleks CDK1/cyklina B kontrolujący ten punkt cyklu. Punkt kontrolny G2/M decyduje o wejściu komórki w fazę mitozy poprzez uaktywnienie kinazy fazy M(MPF, czynnik przyspieszający dojrzewanie), która przyczynia się do rozpoczęcia i przeprowadzenia mitozy [7].

- **Punkty kontrolne mitozy**

W fazie M istotne znaczenie ma powstanie dwubiegunowego wrzeciona mitotycznego. Celem punktu kontrolnego wrzeciona mitotycznego jest nie dopuszczanie do błędów w rozdziale chromosomów podczas mitozy. Punkt kontrolny wrzeciona mitotycznego (ang. spindlecheckpoint) jest aktywowany wszędzie tam, gdzie zachodzą zaburzenia funkcji wrzeciona. Przykłady mogą stanowić zmiany w dynamice powstawania bądź rozpadu mikrotubul, nieprawidłowe przyłączenia się mikrotubul do

kinetochorów na chromosomach mitotycznych lub wskutek działania inhibitorów mikrotubul (np. alkaloidy Vinca, taksany). Kolejnym powodem aktywacji tego punktu kontrolnego może być także brak możliwości przeprowadzenia rozdziału chromosomów podczas przejścia z metafazy do anafazy mitozy. Niekiedy mechanizmy aktywowane przez zaburzenie właściwego wiązania się mikrotubul z kineto chorami oraz niemożliwość rozdziału chromosomów są traktowane, jako dwa różne punkty kontrolne. W tym okresie cyklu komórkowego rozdział chromosomów może ulec wstrzymaniu do czasu, gdy wszystkie chromosomy zostaną właściwie przyłączone do włókien wrzeciona podziałowego. Proces ten jest kontrolowany między innymi przez białko APC [2,8].

Odpowiednie przyłączenie się mikrotubul do wszystkich kinetochorów, występuje wówczas gdy każda para chromatyd jest połączona z przeciwnymi biegunami wrzeciona mitotycznego, powodując wyłączenie sygnału blokującego aktywację kompleksu APC/C (ang. anaphase-promoting complex). Blokada tego kompleksu ma za zadanie hamowanie funkcji białka Cdc20. Kompleks APC/C jest aktywowany, wówczas gdy białko Cdc20 jest funkcjonalne. Następnie kompleks APC/C katalizuje przyłączenie reszt ubikwityny oraz proteolizę cykliny B1 i sekuryty, co skutkuje aktywacją separazy. Enzym ten działa niszcząco na kohezynę, białko, które odpowiada za połączenia między parami chromosomów mitotycznych. To z kolei powoduje separację par chromosomów i ich segregację pomiędzy jądra potomne [2,8].
Po przejściu punktu kontrolnego, zlokalizowanego na granicy metafazy i anafazy, mikrotubule biorą udział w jednoczesnym rozdzielaniu chromatyd. Punkt kontrolny późnej telofazy kontroluje wyjście z mitozy, czyli przejście telofaza/G1. Koniecznym warunkiem wyjścia komórki z mitozy do fazy G1jest degradacja cykliny B. Nieprawidłowy przebieg mitozy skutkuje zatrzymaniem cyklu komórkowego na granicy metafazy i anafazy. W konsekwencji komórka może być skierowana na drogę apoptozy (tzw. katastrofy mitotycznej) [8].

- **Modyfikacja punktów kontrolnych cyklu komórkowego**

Jedną z podstawowych przyczyn transformacji nowotworowej jest utrata kontroli nad przebiegiem cyklu komórkowego. W większości nowotworów człowieka występują mutacje w co najmniej jednym z głównych regulatorów cyklu komórkowego, jakimi są cdk-4, cyklina D, Rb,p16.

W terapii przeciwnowotworowej na ogół stosuje się promieniowanie jonizujące (radioterapia), a także różne związki chemiczne (chemioterapia). Część z tych czynników bezpośrednio bądź pośrednio przyczynia się do powstawania uszkodzeń DNA w komórkach nowotworowych, co prowadzi do apoptozy tych komórek. Taka forma terapii nie jest także obojętna dla pozostałych komórek organizmu, ponieważ stosowanie wysokich dawek promieniowania czy stężeń związków chemicznych może wywołać toksyczne efekty uboczne u chorych. Na przestrzeni ostatnich lat w nowatorskich badaniach terapeutycznych coraz częściej używa się związków chemicznych, które są inhibitorami białek regulujących punkty kontrolne (Tabela 1). Celem tych nowych metod leczniczych jest zmniejszenie dawek standardowych leków przeciwnowotworowych praktykowanych w leczeniu. Zakłada się, że redukcji ulegną toksyczne efekty uboczne radioterapii oraz chemoterapii, co wpłynie na poprawę skuteczności leczenia [2].

Tabela 1. Inhibitory białek regulujących funkcje punktów kontrolnych cyklu komórkowego i ich cele molekularne oraz zdolność do modulacji punktów kontrolnych cyklu komórkowego.

Inhibitor	Cel molekularny	Punkt kontrolny
Wortmanina	Kinazy ATM, ATR i DNA-PK	G1, S i G2/M
LY294002	Kinazy PI3 i PIK w tym ATM i ATR	G1, S i G2/M

Pentoksyfylina	Kinazy ATM, ATR i DNA-PK	S i G2/M
Kofeina	Kinazy ATM, ATR i DNA-PK	S i G2/M
UCN-01	Kinaza Chk1	G2/M
CEP-3891	Kinazy Chk1 i Chk2	G2/M
CEP-6367	Kinazy Chk1 i Chk2	G2/M
Go6976	Kinazy Chk1 i Chk2	G2/M
XL844	Kinazy Chk1 i Chk2	G2/M
Flawopirydol	Cdk1, Cdk2, Cdk4, Cdk7 i Cdk9	G1, S i G2/M
R547	Cdk1, Cdk2 i Cdk4	G1, S i G2/M
Roskowityna	Kinazy Cdk1, Cdk2, Cdk7, Cdk9, ERK1/2, FAK, IRAK4	G1, S i G2/M
R763	Kinazy Aurora A i B	G2/M
AZD1152	Kinazy Aurora A i B	G2/M
MK0457 (VX-680)	Kinazy Aurora A i B	G2/M
LFM-A13	Kinaza Plk-1	G2/M
AG015699	PARP-1	G1, S i G2/M
BSI-201	PARP-1	G1, S i G2/M
Ku59436	PARP-1	G1, S i G2/M
INO-1001	PARP-1	G1, S i G2/M

Celem molekularnym dla modulatorów punktów kontrolnych, oprócz białek bezpośrednio regulujących progresję cyklu komórkowego bądź funkcjonowanie punktów kontrolnych, jak kinazy cyklinozależne czy kinazy sygnalizacyjne punktów kontrolnych chk, związane z odpowiedzią na obecność uszkodzeń DNA w komórce, są także inne białka regulatorowe. Należą do nich białka punktu kontrolnego w mitozie (Plk-1, Aurora), fosfatazy komórkowe (Cdc25) bądź białko PARP-1, odpowiadające za naprawę uszkodzeń DNA w komórkach [2].

- **Inhibitory kinaz ATM/ATR**

Kinazy ATM i ATR są najistotniejszymi regulatorami punktów kontrolnych w fazach S i G2. Ich działanie głównie polega na zatrzymaniu punktów kontrolnych w fazach S i G2, proliferacji na skutek pojawienia się uszkodzeń DNA oraz uruchomienia naprawy powstałych uszkodzeń. Kinaza ATM fosforyluje szereg białek, odgrywających rolę w zatrzymaniu cyklu komórkowego, apoptozie i naprawie DNA. Substratami tej kinazy są: CHH2, p53, BRCA1, RAD9, RAD 17, H2AX, NBS1 i wiele innych. Kinaza ATR również fosforyluje p53, nie tylko w odpowiedzi na uszkodzenia DNA, ale także w odpowiedzi na zatrzymanie elongacji transkrypcji w komórce. Kinazy ATM i ATR są idealnym celem dla małocząsteczkowych modulatorów chemicznych. Blokowanie aktywności tych kinaz, przy użyciu leków uszkadzających DNA, może wpłynąć na większą efektywność terapii [9].

Wykazano, że mutacja w genie ATM powoduje zanik aktywności genu u pacjentów z chorobą ataksji teleangiektazji (zespół Louisa-Bara). Natomiast mutacja zmieniająca aktywność kinazy ATR dotyczy chorych na zespół Seckela. Komórki pobrane od pacjentów z uszkodzeniami w genie ATM lub ATR są

nadmiernie wrażliwe, nie tylko na działanie czynników uszkadzających DNA, ale również promieniowanie jonizujące oraz leki przeciwnowotworowe. Dotychczasowe badania przyczyniły się do odkrycia skutecznych inhibitorów kinaz ATM oraz ATR, takich jak wortmanina oraz pochodna LY294002 [2,9].

Najbardziej znanym inhibitorem kinaz ATM/ATR jest kofeina. Kofeina, jako substancja lecznicza stosowana jest od wielu pokoleń, jej działanie korzystnie wpływa na psychofizyczne i psychomotoryczne samopoczucie. Kofeina to naturalnie występujący alkaloid z grupy metyloksantyn, szeroko stosowany do badania kinaz ATM i ATR. Kofeina w warunkach in vitro hamuje aktywność kinaz, natomiast w warunkach in vivo znosi odpowiedzi punktów kontrolnych cyklu komórkowego. Hamujące działanie kofeiny, ma bezpośredni związek z jej zdolnością do uczulania komórek nowotworowych na czynniki uszkadzające DNA. Mechanizm molekularny uczulającego działania kofeiny w połączeniu ze związkami indukującymi powstawanie uszkodzeń DNA opiera się na znoszeniu działania punktu kontrolnego w fazie G2. Odbywa się to poprzez hamowanie aktywacji kinazy sygnalizacyjnej Chk1/2 przez ATM/ATR, co skutkuje wejściem komórek posiadających uszkodzony genom do fazy mitozy. Kofeina może zakłócać procesy naprawy uszkodzeń DNA poprzez hamowanie enzymów biorących udział w naprawie DNA, na przykład kinazy DNA-PK, co przyczynia się do zwiększenia aktywności czynników uszkadzających DNA wobec komórek nowotworowych. Ponadto wrażliwość komórek nowotworowych jest większa, gdy mają one niefunkcjonalny szlak regulowany przez białko P53. Umożliwia to selektywne uwrażliwianie komórek nowotworowych na zastosowane leki w połączeniu z kofeiną. Pomimo to badania kliniczne leków przeciwnowotworowych skojarzonych z kofeiną zostały przerwane ponieważ zwiększenie efektu przeciwnowotworowego leków uszkadzających DNA wiąże się z stosowaniem kofeiny w stężeniach toksycznych dla człowieka [2,10].

Skutecznym inhibitorem kinaz ATM i ATR jest wortmanina. Wykazano, że posiada ona większe powinowactwo do ATM niż do ATR. Wortmanina jest inhibitorem wiążącym się nieodwracalnie do tak zwanej kieszeni ATP-azowej białek ATM i ATR. Działanie wortmaniny w wysokich stężeniach jest mało specyficzne przez co może blokować aktywność katalityczną także innych kinaz, takich jak DNA-PK, PDK1 czy Akt/PKB. Obecnie nie są prowadzone badania kliniczne nad zastosowaniem wortmaniny w leczeniu chorób nowotworowych ze względu na wysoką toksyczność tego związku dla organizmu. Pomimo to wortmanina jest ogólnie stosowana w badaniach laboratoryjnych, ze względu na poznany mechanizm działania [2,11].

Kolejnym inhibitorem kinaz ATM i ATR jest pochodna LY294002. Związek ten jest odwracalnym inhibitorem kinaz ATM i ATR oraz PI3 i PIK. W porównaniu z wortmaniną, pochodna LY294002 wykazuje aktywność przy wyższych stężeniach oraz posiada zdolność do wiązania się z innymi białkami, szczególnie kinazą CK2. LY294002 może być stosowana jedynie jako struktura wyjściowa w celu odkrycia nowych pochodnych wortmaniny o ulepszonych własnościach farmakologicznych [2,11].

- **Inhibitory kinaz Chk**

Małocząsteczkowe inhibitory kinaz Chk1 i Chk2 są związkami selektywnie działającymi na białka regulujące funkcjonowanie punktów kontrolnych. Prowadzone są badania nad klinicznym zastosowaniem pochodnej staurosporyny, UCN-01 (7-hydroksystaurosporyna), która jest specyficznym inhibitorem kinazy Chk1. Związek ten zwiększa skuteczność przeciwnowotworową leków o różnych mechanizmach działania, w tym inhibitorów topoizomerazy I (topotecan), antymetabolitów (5-fluorouracyl i arabinozyd cytozyny) oraz związków metylujących, bądź wiążących się kowalencyjnie z DNA (temozolomide, mitomycyna C, cisplatyna). Pomimo wielu zalet, związek

UCN-01 powoduje także efekty uboczne u chorych m.in. zwiększa stężenia glukozy we krwi (hyperglikemia). Kolejną pochodną staurosporyny znajdującą zastosowanie, jako modulator kinaz punktów kontrolnych, jest indolokarbazolowa pochodna Go6976. Związek ten jest nie tylko inhibitorem kinazy Chk1, ale również Chk2. Cechuje go niska toksyczność, a także większa specyficzność w porównaniu z UCN-01. Obecnie prowadzone są badania przedkliniczne oraz kliniczne, nie tylko pochodnych staurosporyny, ale również wielu innych związków posiadających zdolność hamowania kinaz Chk1 i Chk2, takich jak XL844, CEP-3891 i CEP-6367 [2,12].

Dotychczasowe badania wykazały, że hamowanie aktywności kinazy Chk1 może zwiększyć efekt cytotoksyczny inhibitorów wrzeciona mitotycznego, poprzez zwiększanie umiejętności komórek do podlegania katastrofie mitotycznej. Potwierdzenie wyników tych badań in vivo, może wpłynąć na poszerzenie możliwości modulowania skuteczności przeciwnowotworowej leków przez inhibitory Chk1 oraz leki zakłócające czynności wrzeciona mitotycznego pochodzące z grup, takich jak alkaloidy barwinka (winkrystyna, winblastyna) bądź taksany (paklitaksel, taksol) [2,13].

- **Inhibitory kinaz zależnych od cyklin**

Wejście komórki w kolejne fazy cyklu komórkowego regulują również kinazy zależne od cyklin (cdk), których aktywność jest kontrolowana głównie przez molekularne mechanizmy punktów kontrolnych. W przypadku zwiększenia aktywności cdk może dojść do rozregulowania cyklu komórkowego oraz upośledzenia funkcjonowania punktów kontrolnych w komórkach nowotworowych. Natomiast inhibicja cdk w komórkach nowotworowych prowadzi do zatrzymania proliferacji i śmierci na drodze apoptozy [14].

Obecnie prowadzone są badania kliniczne flawopirydolu, związku z grupy flawonoidów, który przejawia aktywność wobec Cdk1, Cdk2, Cdk4, Cdk7 i Cdk9. Mechanizm działania tego związku polega na wiązaniu się w kieszeni ATP-azowej kinaz cdk. Ponadto posiada on zdolność do hamowania transkrypcji przez wiązanie się z czynnikiem elongacyjnym P-TEFb. Czynnik ten przyczynia się do wydłużenia transkryptu RNA podczas transkrypcji DNA. Flawopirydol jest skuteczny w leczeniu białaczek, niedrobnokomórkowego raka płuc oraz nowotworów żołądka, jelita i nerki. Może on być stosowany samodzielnie lub w połączeniu z innymi lekami [2,15].

Kolejnym związkiem znajdującym się w II fazie badań klinicznych jest roskowityna, związek z grupy puryn, posiadający podobny mechanizm działania jak flawopirydol. Roskowityna w stężeniach mikromolowych wykazuje zdolność do hamowania kompleksów Cdk1/cyklina B, Cdk2/cyklina E, Cdk7/cyklina H, Cdk9/cyklina T1 oraz innych kinaz, takich jak IRAK4 ,ERK1/2 czy FAK [2,16].

Prowadzone są także liczne badania nad innymi inhibitorami cdk, m.in. pochodną pirymidyny, R547. Mechanizm działania tego związku jest podobny do flawopirydolu i roskowityny. Wykazano, że w warunkach in vitro R547, w stężeniach nanomolowych, posiada zdolność do hamowania kinaz Cdk1, Cdk2 i Cdk4. Pochodna R547 hamuje proliferację komórek nowotworowych bez względu na ich pochodzenie tkankowe i zachowuje aktywność względem komórek z fenotypem oporności wielolekowej. Aktualnie prowadzone są badania kliniczne tego związku [2,17].

- **Białka punktu kontrolnego w mitozie**

Prawidłowy przebieg podziału mitotycznego wymaga zaangażowania wielu białek regulatorowych, w tym kinaz białkowych Aurora bądź Plk-1. Białka te są odpowiedzialne za regulację dojrzewania centrosomów, segregację chromosomów oraz cytokinezę. Nieprawidłowe funkcjonowanie tych białek

ma znaczenie w procesie transformacji nowotworowej. Komórki człowieka posiadają trzy izoformy enzymu Aurora - Aurora A, B oraz C. Jednak główną rolę w komórce pełnią Aurora A i B. Obecnie prowadzone są badania kliniczne nad związkami blokującymi aktywność tych kinaz, w tym pochodnych AZD1152 (Astra-Zeneca), R763 (Rigel/Sereno), K0457 (VX-680) (Merck). Prowadzone są także badania nad selektywnymi inhibitorami kinazy Plk-1, które pełnią istotną rolę podczas przejścia przez mitozę, zwłaszcza w regulacji cytokinezy, jak również uczestniczą w odpowiedzi komórki na uszkodzenia DNA. Zwiększona aktywność tego enzymu została wykryta w kilku rodzajach nowotworów. Syntetycznym inhibitorem kinazy Plk-1 jest LFM-A13 (alfa-cyano-beta-hydroxy-beta-metylo-N-(2,5-di-bromofenylo)propenamid), wykazujący wysoką selektywność w stosunku do tego białka [2,18].

- **Inhibitory fosfataz**

Inhibitory fosfataz stanowią potencjalny cel molekularny terapii kombinowanej ponieważ spełniają ważną rolę w regulacji wielu procesów komórkowych. Pomimo to liczba rodzajów fosfataz komórkowych jest niewielka w porównaniu do kinaz. Prowadzone są liczne badania zmierzające do odkrycia inhibitorów selektywnie hamujących aktywności fosfataz. Naukowcy skupiają swoją uwagę nad fosfatazami z rodziny Cdc25, gdyż ich nadekspresję stwierdza się w kilku typach nowotworów. Obecnie jednak nie prowadzi się badań klinicznych nad inhibitorami fosfataz Cdc25 [2,19].

- **Inhibitory PARP-1**

Poli-ADP-rybozyl (PARP-1) jest białkiem jądrowym zdolnym do tworzenia heterodimerów. PARP-1 odpowiada za wykrywanie uszkodzeń DNA oraz bierze udział w procesach naprawczych DNA na każdym etapie cyklu komórkowego. Białko to po wykryciu uszkodzenia DNA, wiąże się w miejscu jego powstania, a następnie katalizuje przyłączanie wielu grup ADP-rybozy do swojej jednostki katalitycznej (automodyfikacja). PARP-1 może także modyfikować wiele innych białek komórkowych przez co ułatwia naprawę uszkodzeń DNA. Ponadto białko PARP-1 pełni niezbyt dobrze poznane funkcje w regulacji bloku G2, który jest aktywowany przez związki przeciwnowotworowe. Dzięki czemu istnieje możliwość wykorzystania tego białka w połączeniu z klasycznymi lekami jako cel molekularny w terapii nowotworowej. Na dzień dzisiejszy w fazie badań klinicznych znajduje się kilka związków, które są inhibitorami PARP-1. Należą do nich Ku59436 (Astra-Zeneca), związek stosowany w monoterapii w leczeniu nowotworów litych oraz AG015699 (Pfizer), związek stosowany w połączeniu z lekiem przeciwnowotworowym - temozolomidem w leczeniu nowotworów litych i nowotworów skóry. Ponadto w leczeniu nowotworów mózgu, skóry oraz nowotworów litych wprowadzono leczenie za pomocą BSI-201 (BiPar) i INO-1001 (Inotek/Genetech). Inhibitory te znacznie poprawiają wynik terapeutyczny związków powszechnie stosowanych w leczeniu klinicznym [2,20].

Podsumowanie

W większości komórek nowotworowych dostrzega się zmiany w mechanizmach regulujących progresję cyklu komórkowego. Dlatego też odkrycie i zarazem poznanie funkcjonowania punktów kontrolnych cyklu komórkowego było ogromnym przełomem w zrozumieniu reagowania komórek nowotworowych, jak również ich reakcji na leki. Umożliwiło to wykorzystanie mechanizmów regulacji punktów kontrolnych jako celów dla nowatorskich strategii terapeutycznych w leczeniu nowotworów. Opiera się ona na połączeniu radioterapii bądź chemioterapii z małocząsteczkowymi modulatorami punktów kontrolnych, zdolnych do „uczulania" komórek nowotworowych na działanie czynników terapeutycznych. Wciąż trwają poszukiwania kolejnych modulatorów, mających różne

cele molekularne i pożyteczne własności farmakologiczne, czyli wysoką aktywność oraz specyficzność przy niskiej toksyczności. Wiąże się też duże nadzieje nad zastosowaniem terapii kombinowanych, w których łączy się standardowe leki przeciwnowotworowe z modulatorami funkcji punktów kontrolnych. Niebawem będą one stosowane w praktyce klinicznej przez co wpłyną na poprawę skuteczności terapii przeciwnowotworowych.

Słowa kluczowe: cykl komórkowy, punkty kontrolne, inhibitor, terapia przeciwnowotworowa.

Literatura:

1. Yamasaki L. Role of the RB tumor suppressor in cancer. Cancer Treat. Res. 2003. 115, 209-239.
2. Sabisz M., Składanowski A. Cykl komórkowy jako cel nowych terapii przeciwnowotworowych. Na pograniczu chemii i biologii. 2007. Tom XVII, 111-131.
3. Furth E.E., Gustafson K.S., Dai C.Y., Gibson S.L., Menard-Katcher P., Chen T., Koh J., Enders G.H. Induction of the tumor-suppressor p16(INK4a) within regenerative epithelial crypts in ulcerative colitis.Neoplasia. 2006. 8, 429-436.
4. Cortez D., Glick G., Elledge S.J. Minichromosome maintenance proteins are direct targets of the ATM and ATR checkpoint kinases. Proc. Natl. Acad. Sci. 2004. 101, 10078-10083.
5. Zhang Y.W., Otterness D. M., Chiang G.G., Xie W., Liu Y.C., Mercurio F., Abraham R.T. Genotoxic stress targets human Chk1 for degradation by the ubiquitin- proteasome pathway. Mol. Cell. 2005. 19, 607-618.
6. Wang X.Q., Redpath J.L., Fan S.T., Stanbridge E.J. ATR dependent activation of Chk2. J. Cell. Physiol. 2006. 208, 613-619.
7. Chan T.A., Hwang P.M., Hermeking H., Kinzler K.W., Vogelstein B. Cooperative effects of genes controlling the G(2)/M checkpoint. Genes Dev. 2000. 14, 1584-1588.
8. Musacchio A., Salmon E.D. The spindle-assembly checkpoint in space and time. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2007. 8, 379-393.
9. Alderton G.K., Joenje H., Varon R., Borglum A.D., Jeggo P.A., O'Driscoll M. Seckel syndrome exhibits cellular features demonstrating defects in the ATR-signalling pathway. Hum. Mol. Genet. 2004. 13,3127-3138.
10. Zhou B.B., Chaturvedi P., Spring K., Scott S.P., Johanson R.A., Mishra R., Mattern M.R., Winkler J.D., Khanna K.K. Caffeine abolishes the mammalian G(2)/M DNA damage checkpoint by inhibiting ataxia-telangiectasia-mutated kinase activity. J. Biol. Chem. 2000. 275, 10342-10348.
11. Lawlor M.A., Alessi D.R. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? J. Cell. Sci. 2001. 114, 2903-2910.
12. Tse A.N., Carvajal R., Schwartz G.K. Targeting checkpoint kinase 1 in cancer therapeutics. Clin. Cancer Res. 2007. 13, 1955-1960.
13. Syljuasen R.G., Sorensen C.S., Nylandsted J., Lukas C., Lukas J., Bartek J. Inhibition of Chk1 by CEP-3891 accelerates mitotic nuclear fragmentation in response to ionizing radiation. Cancer Res. 2004. 64, 9035-9040.
14. Malumbres M., Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. Nat. Rev. Cancer. 2001. 1, 222-231.
15. Shapiro G.I. Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. J. Clin. Oncol. 2006. 24, 1770-1783.
16. Whittaker S.R., Walton M.I., Garrett M.D., Workman P. The cyclindependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine) inhibits RB phosphorylation, causes loss of cyclin D1 and activates the mitogen activated protein kinase pathway. Cancer Res. 2004. 64, 262-272.
17. DePinto W., Chu X.J., Yin X., Smith M., Packman K., Goelzer P., Lovey A., Chen Y., Qian H., Hamid R., Xiang Q., Tovar C., Blain R., Nevins T., Higgins B., Luistro L, Kolinsky K., Felix B., Hussain S., Heimbrook D. In vitro and in vivo activity of R547: a potent and selective

cyclin-dependent kinase inhibitor currently in phase I clinical trials. Mol. Cancer Ther. 2006. 5, 2644-2658.
18. Uckun F.M., Dibirdik I., Qazi S., Vassilev A., Ma H., Mao C., Benyumov A., Emami K.H. Anti-breast cancer activity of LFM-A13, a potent inhibitor of Polo-like kinase (PLK). Bioorg. Med. Chem. 2007. 15, 800-814.
19. Contour-Galcera M.O., Sidhu A., Prevost G., Bigg D., Ducommun B. What's new on CDC25 phosphatase inhibitors. Pharmacol. Ther. 2007. 115, 1-12.
20. Schreiber V., Dantzer F., Ame J.C., de Murcia G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2006. 7, 517-528.
21. http://micro-scopic.tumblr.com/image/29061928178

https://laboratoria.net/artykul/20472.html
Informacje dnia: Nowa metoda stereo EEG daje szansę pacjentom z lekooporną padaczką Wrocław/ Muzeum Medycyny Sądowej Wirus Nipah nie stanowi obecnie dla nas zagrożenia epidemicznego Tłuszcz beżowy wpływa na ciśnienie krwi Obiecująca metoda leczenia raka trzustki Przeszczepy kałowe mogą zwiększyć skuteczność leczenia raka nerki Nowa metoda stereo EEG daje szansę pacjentom z lekooporną padaczką Wrocław/ Muzeum Medycyny Sądowej Wirus Nipah nie stanowi obecnie dla nas zagrożenia epidemicznego Tłuszcz beżowy wpływa na ciśnienie krwi Obiecująca metoda leczenia raka trzustki Przeszczepy kałowe mogą zwiększyć skuteczność leczenia raka nerki Nowa metoda stereo EEG daje szansę pacjentom z lekooporną padaczką Wrocław/ Muzeum Medycyny Sądowej Wirus Nipah nie stanowi obecnie dla nas zagrożenia epidemicznego Tłuszcz beżowy wpływa na ciśnienie krwi Obiecująca metoda leczenia raka trzustki Przeszczepy kałowe mogą zwiększyć skuteczność leczenia raka nerki

Partnerzy