

Enzim inhibitorok használata gyógyászatban

A rákellenes küzdelem lehetséges célpontjai: a mitotikus kinezinek

Szakdolgozat
Biológia alapszak, biológus szakirány

Készítette:

MOLNÁR ESZTER

Témavezető:

DR. KOVÁCS MIHÁLY, habilitált tudományos főmunkatárs
ELTE Biokémiai Tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2010

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Rövidítésjegyzék	3
Bevezető	4
1. A mitózis és a kinezinok.....	5
2. A Kinesin Spindle Protein.....	8
2.1. KSP inhibitorok.....	10
2.1.1. ATP unkompetitív inhibitorok	10
2.1.1.1 A monasztrol	10
2.1.1.2. Az ispinesib	13
2.1.1.3 Egyéb ATP unkompetitív inhibitorok	15
2.1.2 ATP-kompetitív inhibitorok	16
2.1.2.1. Biarilok.....	16
2.1.2.2. Tiazolok.....	18
2.2. KSP inhibitorok farmakofórájának megállapítása	19
2.3. A KSP-inhibíció által kiváltott sejthalál mechanizmusa.....	20
2.4. Klinikai tapasztalatok	23
3. A Centroméra asszociált protein-E	24
Következtetés	27
Summary	29
Felhasznált irodalom	30
Köszönetnyilvánítás	32

Rövidítésjegyzék

APC	Anafázis elősegítő komplex
ATP	Adenozin trifoszfát
CENP-E	Centroméra asszociált protein E
IC	Inhibítor koncentráció
KSP	Kinesin Spindle Protein
KSPi	KSP inhibítor
MTOC	Mikrotubulus Organizáló Régió
NTP	Nukleotid trifoszfát
PgP	P-glikoprotein
Pi	Inorganikus foszfát

Bevezető

Napjaink vezető halálocai közé tartoznak a rákos folyamatok okozta megbetegedések. Ennek okán a klinikai kutatások kiemelten fontos területe az újabb és újabb potenciális rákellenes célpontok azonosítása. Bár az egyes rákfajták tulajdonságaikban eltérnek egymástól, azt elmondhatjuk róluk, hogy közös jellemzőjük a tumoros sejtek korlátlan szaporodása.

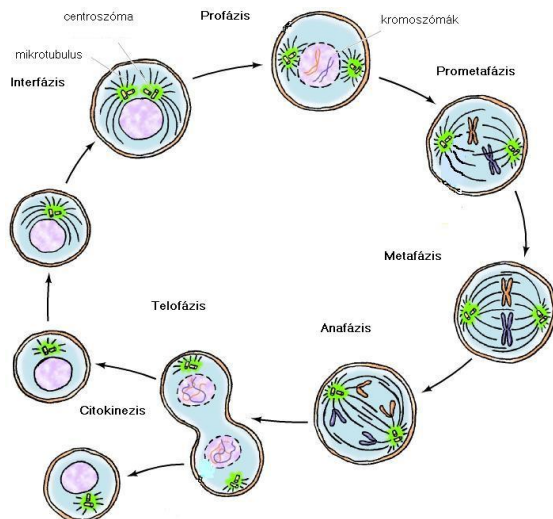
A mitotikus orsó mint kemoterápiás célpont már régóta ismert. A hagyományos szerek, például a vinca alkaloidák és a taxánok, a mikrotubulusra gyakorolnak hatást. A mikrotubulusok fontos komponensei a mitotikus orsónak, azonban meghatározó szerepet töltenek be olyan nem osztódó sejtek életében is, mint a neuronok. Ezzel összefüggésben a taxánok alkalmazásának mellékhatásaként perifériás neuropátia, vagyis a külső idegpályák elhalása tapasztalható. A sejtek osztódási folyamataiban, a mikrotubuluson kívül számos enzim működik közre, amelyek csak osztódó sejtekben van jelen. Ide tartoznak a kinezinek is. Ezeknek a fehérjéknek a gátlásával káros következmények nélkül tudnánk a proliferáló sejtekre szelektív hatást gyakorolni (Duhl és Renhowe, 2005).

A kinezinek motor aktivitású enzimek lévén számos különleges tulajdonsággal bírnak. A motorfehérjék közös jellemzőjeként elmondható, hogy működésükhöz energiát igényelnek. Munkavégzésük során ezt az energiát alakítják át mechanikai erő kifejtésé. A mechanikai erő kifejtés lineáris motorok esetén egy sín mentén valósul meg, amely szerepet mitotikus kinezinek esetén az orsó mikrotubulusai töltenek be. Az eddig felfedezett mitotikus kinezin inhibitorok hatása az enzim NTP-áz aktivitásának blokkolásán keresztül valósul meg. Az inhibitorok közül néhány már klinikai tesztelés alatt áll.

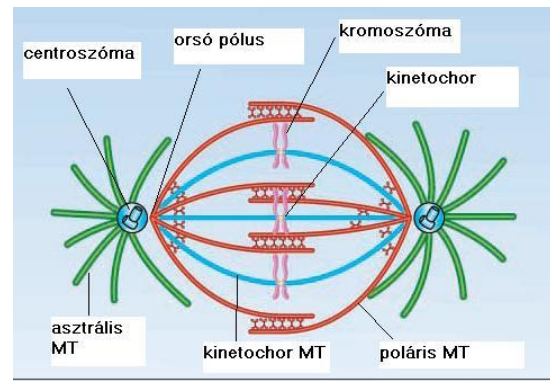
Szakedolgozatomban a mitotikus kinezinek funkciójáról, inhibitorairól, gátlásuk mechanizmusáról, valamint klinikai használatban betölthető szerepéről írtam összefoglalót, különös tekintettel a Kinesin Spindle Proteinre, melynek szakirodalmá tekinthető a leginkább teljesnek a témában.

1. A mitózis és a kinezinek

A mitózis folyamatának központi eseménye a kromoszómák szétválása. A mitózis öt fázisát különböztetjük meg, melyek a következők: profázis, prometáfázis, metafázis, anafázis és telofázis. A profázis három fontos eseménye a kromoszómák kondenzálódása, a sejtközpont kettéválása valamint a magorsó összeszerelődése. Profázis során a sejtközpont mikrotubulus-szervező aktivitása lényegesen megnő, a mikrotubulus-váz depolimerizálódik, ugyanakkor a sejtközpont két részre válik és körülöttük gyors ütemben új mikrotubulusok kezdenek szerveződni. A mikrotubulusok „+” végei mindig kifelé (a sejtmembrán irányába) irányulnak, míg „-” végei a sejtmag két oldalán elhelyezkedő két sejtközpont anyagába ágyazódnak. A prometáfázis fő eseménye a szállítandó kromoszómák és a szállítóeszköz – a mitotikus orsó – összekapcsolása. A mitotikus orsó mikrotubuláris rendszere asztrális, poláris és kinetochor mikrotubulusokból áll. Előbbiek csillagszerűen ágaznak szét a pólusból a sejtfelszín felé, a kinetochor mikrotubulusok a kromoszómákat kapcsolják a pólusokhoz, a poláris mikrotubulusok az ellentétes pólus felé irányulnak és a magorsó felező síkjában egymás közé csúsznak. Mindhárom mikrotubulus-csoportnak szerepe van a kromoszómák szétválasztásában. A prometáfázis során a kromoszómák a két pólus között véletlenszerűen ide-oda mozognak, míg végül a testvérkromatidák a kinetochór régiójukon keresztül egyenként az ellentétes pólusokhoz kapcsolódnak. A metafázisban a kromoszómák a sejt ekvatoriális síkjába rendeződnek. Erre az készíteti őket, hogy a két kromatidára a pólusok felől ható ellentétes irányú húzó- és taszítóerők a felezővonalban egyenlítik ki egymást. Az anafázis a testvérkromatidák gyors szétválásával kezdődik, majd a szétvált kromatidák elkezdnek az ellentétes pólusok felé vándorolni. A szegregáció kétféle mozgás eredője: egyrészt az utódkromoszómák közelednek a pólusok felé, mivel a kinetochor-mikrotubulusok fokozatosan depolimerizálódnak, másrészt a két pólus távolodik egymástól, aminek elsődleges oka az, hogy a poláris mikrotubulusok szétesúsznak, széttolva a pólusokat a hozzájuk kötött kromoszómákkal együtt. Telofázisban a kromatidák elérnek a pólusokig, majd dekondenzálódnak. Az új sejtmagok kialakulnak, valamint a citoplazma elkezd befűződni a két sejtmag között. Végül a citokinezis során a két leánysejt véglegesen elválik egymástól (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cooper&part=A2470>). (1. ábra)



A sejtosztódás fázisai: profázis, prometáfázis, metafázis, anafázis, telofázis, citokinezis



A metafázisos mitotikus orsó (MT=mikrotubulus)

1. ábra

Bal oldali kép: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cooper&part=A2470>

Jobb oldali kép: (Sarli és mtsai, 2008)

A kinezin motorfehérjék, vagyis kémiai energiát alakítanak át mechanikai erőkéféjtsé. Minden kinezin rendelkezik a konvencionális kinezinéhez hasonló nehéz láncsal, amely három doménből áll: a motor, a törzs és a fark doménből. A motordomén tartalmazza a katalitikus magot és a MT mentén történő továbbhaladást elősegítő nyak régiót. A törzsdomén felelős a *coiled-coil* struktúra révén létrejövő dimerizációért, a farkdomén pedig a partnerfehérjékkel való kölcsönhatásokért. A motordomén elhelyezkedhet a fehérje N-terminális (Kin-N), C-terminális részén (Kin-C) valamint a nehéz lánc belsejében is (Kin-I). A Kin-N kinezinnek a mikrotubulusok „+” vége felé, a Kin-C kinezinnek a „-” vég felé mozognak. A Kin-I kinezik az ATP hidrolíziséből nyert energiát a mikrotubulus aktív destabilizálására fordítják. Mindhárom típusú kinezin fontos szerepet tölt be a sejtosztódás folyamán. A kinezin szerepe a sejtosztódásban a mikrotubulusokkal, a mitotikus orsó fő komponenseivel való interakción keresztül valósul meg. Könnyen belátható az a tény, hogy ezeknek a motorfehérjéknek a gátlásával alapvetően befolyásolhatjuk a sejtosztódás folyamatát: mitózis megállást, ennek következtében pedig akár apoptózist indukálhatunk a sejtekben. Jelenleg nyolc olyan tag ismert a kinezinok közül, amelyek a mitózisban játszanak szerepet és három olyan kinezint írtak le, amelyek a citokinezis folyamatában vesznek részt. Részletes funkciójuk bemutatására nem térek ki, a fő adatok az 1. táblázatban láthatóak (Bergnes és mtsai, 2005).

1. táblázat: Kinezinok szerepe a gerincesek sejtjeinek osztódásában (Bergnes és mtsai, 2005)

Kinezin	Lokalizáció	Depléciós fenotípus	Biokémiai aktivitás
KSP	Orsó/pólus	Monopoláris orsó	„+” vég irányú motor
Kif2a	Orsó/pólus/középzóna ¹	Monopoláris orsó	mikrotubulus destabilizáció
CENP-E	Kinetochor/középzóna	Kétpólusú orsó rendezetlen kromoszómákkal	„+” vég irányú motor
MCAK	Kinetochor régió és az orsó pólusai	Hosszú asztrális mikrotubulusok, rendezetlen kromoszómák	mikrotubulus destabilizáció
HSET (KifC1)	Orsó/pólus	Nincs hatás	„-” vég motor
HsKif15	Orsó/pólus/középzóna	Nincs adat	
Kid	kromoszóma	Kromoszóma orientációs hiba	„+” vég motor
Kif4	Kromoszóma/középzóna/középtest ²	Centrális orsó szerveződési hiba	„+” vég motor
MKLP1	Orsó/középzóna/középtest	Citokinezis megállás	Antiparalell mikrotubulus csúszás
MKLP2	Orsó/középzóna/középtest	Citokinezis megállás	mikrotubulus csúszás
MPP1	Középzóna/középtest	Citokinezis megállás	„+” vég motor, mikrotubulusok csomagolása

A publikációk számát tekintve a Kinesin Spindle Protein (KSP) a legintenzívebben kutatott a sejtosztódásban részt vevő kinezinok közül. Ez a fehérje a mitózis korai szakaszában aktív, mikor a kétpólusú mitotikus orsó szerveződik. Kísérletek bizonyítják, hogy a KSP gátlásával el lehet érni rákos sejt vonalak apoptózisát, sőt az inhibitorai közül néhányan már sikerült belépnie a klinikai használatban való tesztelés fázisába is. Ezek az eredmények azt indítványozzák, hogy a KSP gyógyászatban felhasználható lehetőségekkel rendelkező rákellenes célfehérje, ezért szerkezetének, inhibitorokkal való kötődési mechanizmusának jobb megértése szükséges a hatékony gátlószerek kifejlesztéséhez.

¹ Középzóna: a mitotikus orsó felezővonalának területe

² Középtest: átmeneti sejtorganelum, mely a citoplazma-szétváláshoz szükséges

2. A Kinesin Spindle Protein³

A KSP-t először *Xenopus* petesejtéből sikerült izolálni cDNS-screen segítségével. Korábbi tanulmányok *Xenopus* és *Drosophila* modelleken kimutatták azt, hogy KSP antitestet adva a rendszerhez, az meggátolta a centroszóma szeparációt és monoasztrális orsó-elrendeződést indukált. Humán sejtekben elvégezve a kísérletet hasonló eredményre jutottak (Huszár és mtsai, 2009). A KSP funkciója jól detektálható az expressziós profilja alapján. A KSP expressziója a legnagyobb mértékben az olyan gyakran osztódó sejtekben figyelhető meg, mint a tímusz, a mandulák, nyelőcső epitélium és a csontvelő, míg az osztódásra nem képes központi idegrendszer sejtjeiből hiányzik (Sakowicz és mtsai, 2004).

A KSP a BimC kinezin család tagja, „+” vég irányultságú motorfehérje. A KSP N-terminális régiója tartalmazza a motor régiót, ahol az ATP- és mikrotubulus-kötő helyeket találjuk. A motor régió mellett található a törzs, majd azt követően a farokrégió. A motordomén felelős az ATP-hidrolízisért, vagyis a mozgáshoz szükséges energia megszerzéséért. A törzs és a farok régió az oligomerizációhoz szükséges. A végső szerkezet két, kb. 250 kDa molekulásúlyú antiparalel homodimerből áll össze homotetramer formává (2. ábra).

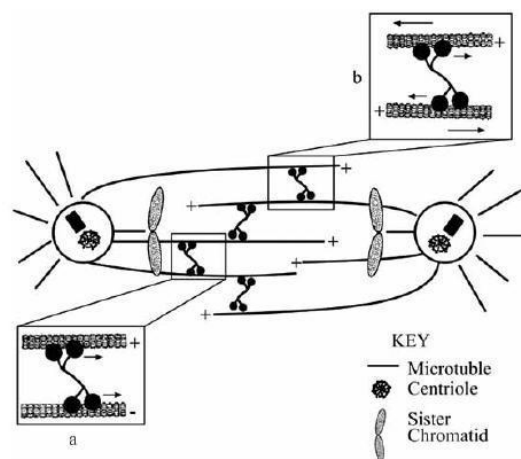


2. ábra: A KSP kötése a mikrotubulushoz. A KSP homotetramer szerkezetű kinezin, amely két antiparalel dimerből áll. A négy szürke ellipszis a motor doméneket jelöli (Bergnes és mtsai, 2005)

³ Az enzim ortológjainak az elnevezése a következő: Eg5 (*Xenopus laevis*), Cin8p és Kip1p (*Saccharomyces cerevisiae*), KLP61F (*Drosophila melanogaster*), HsEg5 (*Homo sapiens*), BMK-1 (*Caenorhabditis elegans*) és AtKRP125a, b, c (*Arabidopsis thaliana*). A KSP név a humán ortológ elnevezése a HsEg5 mellett (Ferenz és mtsai, 2010).

A KSP fő feladata, hogy elválassza a mitotikus orsó pólusait és megfelelő formába rendezze azokat a mitózis során. Munkája elvégzéséhez a mikrotubulushoz kell kapcsolódnia. A fehérje C-terminális része tartalmaz egy úgynevezett BimC boxot, amely magába foglal egy foszforilálásra alkalmas régiót. A BimC box két konzervált aminosavának, egy alaninnak és egy treoninnak a mutációja meggátolja a motor lokalizációját az orsó mikrotubulusaira. Ebből arra következtethetünk, hogy a KSP és a mikrotubulus kapcsolódását sejtciklus-függő foszforiláció szabályozza (Ferenz, 2010).

A mitotikus orsó mikrotubulusainak pozitív vége a citoplazmába, negatív vége a MTOC felé néz. A KSP kétféleképpen kötheti meg a mikrotubulust. Az egyik variációban a KSP két azonos orientációjú mikrotubulust köt. Ezzel a kapcsolódással a mitotikus orsó tengelye alakul ki. A másik lehetőség az, ha a KSP két ellentétes orientációjú mikrotubulust köt. A kinezin ebben az esetben ellentétes irányba képes tolni a mikrotubulusokat, ezáltal az orsó pólusai eltávolodnak egymástól (Zhang és Xu, 2008). A folyamat ábrázolása a 3. ábrán látható.



3. ábra. A KSP funkciójának modellezése. Az a és b jelöléssel a kisebb bekeretezett részek kinagyításait vannak feltüntetve. A hosszabb nyilak a mikrotubulusok, míg a rövidebb nyilak a KSP mozgási irányát jelölik. (Sharp és mtsai, 1999)

A KSP korai mitózis fázisban betöltött meghatározó szerepe miatt ez a kinezin attraktív célpont lehet a gyógyításban is. A KSP túlexpresszációja megfigyelhető számos szolid tumor és leukémia esetében. Megfigyelték azt is, hogy az Eg5 túlzott kifejeződése nagy valószínűséggel különböző tumortípusok genéziséhez vezet. A KSP túlzott kifejeződése gátolta a mitotikus orsó normális működését, a kromoszómák hibás szétválását és aneuploidiát okozva a sejtekben. Korreláció mutatható ki a tüdőrákos betegek kemoterápiára való reagálása és az Eg5 expressziója között. Az Eg5 pozitív tumorok szignifikánsan jobban

reagáltak az antimitotikus szereket is alkalmazó kemoterápiás kezelésekre (Huszar és mtsai, 2009).

A monasztrol, mint első KSP inhibitor felfedezése óta nagy az érdeklődés a KSP gátlószerek területe iránt. Ez újabb és újabb vegyületek kifejlesztéséhez vezetett. Közülük számos mutatott effektív hatást tumoros sejtvonalak és egér tumor modellek esetében is. A KSP inhibitorok nagy előnye az is, hogy paclitaxel rezisztens sejtvonalakra is hatásosnak bizonyultak, mely vegyület a mikrotubulus depolimerizációját gátolja (Huszar és mtsai, 2009).

Habár az KSP inhibíció által kiváltott apoptózis molekuláris mechanizmusa még nem teljesen ismert, az eddigi ez irányban végzett kutatás eredményeit egy későbbi fejezetben foglaltam össze.

2.1. KSP inhibitorok

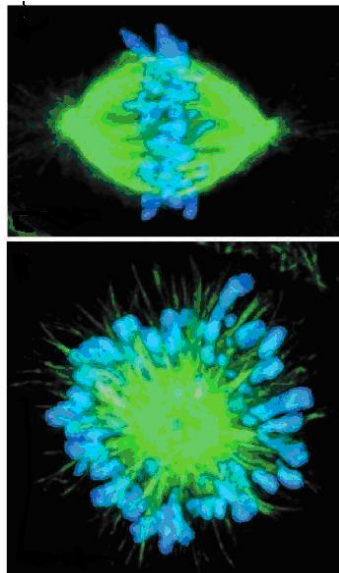
2.1.1. ATP unkompetitív inhibitorok

2.1.1.1 A monasztrol

Az első potenciális KSP inhibitorot Mayer és munkatársai írták le 1999-ben (Mayer és mtsai, 1999). A monasztrol felfedezése korszakalkotónak számított, mivel lavinaszerűen indította meg a további kutatásokat az újabb gátlószerek kifejlesztéséhez. A monasztrol és KSP kötési szerkezetének modellezése fontos kiindulópont volt a racionális inhibitor-tervezéshez. Kitüntetett szerepe miatt fontosnak tartom a felfedezés menetének ismertetését.

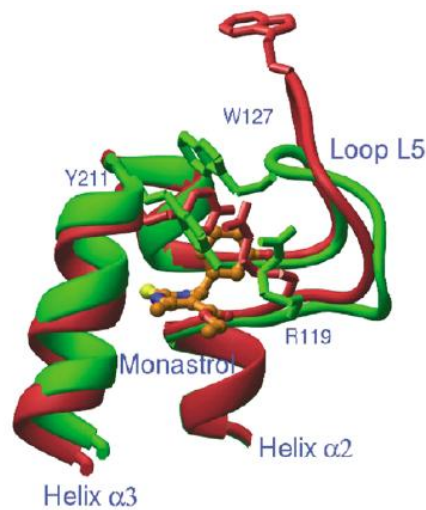
A kísérlet célja az volt, hogy olyan kicsi, sejtbe bejutó molekulákat találjanak, amelyek gyorsan fejtik ki a hatásukat és a mitózisban résztvevő enzimekre hatnak. Először egész sejtet detektáló immunoassay segítségével olyan vegyületeket kerestek, amelyek növelik a foszforilált nukleolin szintet a sejtben. A nukleolin foszforilációja azt jelenti, hogy a sejt a mitózis fázisba lépett. Ezzel a módszerrel 16 320 jelölt közül 139 vegyületet választottak ki. A 139 anyag hatását megvizsgálták a mikrotubulusra is. Úgy találták, hogy a 139 vegyület közül 52 gátolta a tubulin polimerizációt, 1 aktiválta, 86-nak pedig nem a tubulinra volt hatása. Az utóbbiak hatását először vesekéreg sejtben fluoreszcens mikroszkópiával vizsgálták tovább. Azt nézték meg, hogy a vegyületek a kromoszómákra, aktinra valamint a tubulinra

milyen hatást fejtenek ki. Megfigyeléseik közül 27 esetben növekedett a normális mitózisképet mutató sejtek száma. Ebből arra következtettek, hogy ezek a molekulák sejtciklus-szabályozásra ható fehérjéket gátolták – ennek okán rekedt meg a mitózis. A további vegyületek közül 42 interfázisban is hatott, ezek depolimerizálták az interfázisos mikrotubulusokat is. Végül csak öt olyan potenciális vegyület maradt, amely csak a mitózis során fejtette ki hatását. Egy bizonyos gátlószer esetében bipoláris mitotikus orsó helyett monoasztrális orsó-elrendeződést láttak, vagyis középen helyezkedett el a mikrotubulus, körülötte pedig a kromoszómák (4. ábra). Négyórás monasztrollal történő kezelés során a sejtekben a mitózis leállt, és 90%-ban megfigyelhető volt a monoasztrális orsó-elrendeződés, amelyről a vegyület a monasztrol nevet kapta. Korábban elvégzett genetikai kísérletekből már tudták, ha az Eg5 kinezint Eg5-antitesttel kezelve ugyanilyen monoasztrális orsó fenotípust kaptak. Ebből következtettek arra, hogy a monasztrol is az Eg5-re hat. Mivel a négyórás monasztrollal történő kezelés után elvégzett kimosást követően a mitózis végbement, elmondható, hogy az inhibitor kötése reverzibilis folyamat. A fluoreszcens mikroszkópos képek alapján megfigyelték azt is, hogy a monasztrol nem gátolja meg a mikrotubulus és kromoszóma összekapcsolódását. A konvencionális kinezinre, amely 33 %-os szekvencia-egyeztést mutat az Eg5-tel, nem volt gátló hatása. Ez fontos adat, hiszen így kiderült, hogy egy specifikus kinezin-gátlószer sikerült azonosítani (Mayer és mtsai, 1999).

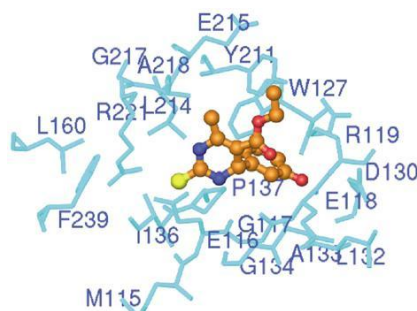


4. ábra: BS-C-1 sejtek immunfluoreszcens képe (α -tubulin: zöld, kromatin: kék) 4 órás 0,4 %-os DMSO (dimetil-szulfoxid: oldószer kontroll) és 68 μ M monasztrol kezelés után. Az felső képen a kontroll esetben tapasztalható bipoláris mitotikus orsó, míg az alsó képen a monasztrollal kezelt sejt monoasztrális orsó elrendeződése látható.

A KSP szerkezetét monasztrollal és MgADP-vel komplexet alkotva Yan és munkatársai írták le 2004-ben. A kísérletben a monasztrol aktív izomerjét, az S-enantiomert használták fel. Úgy találták, hogy a monasztrolkötő zseb az $\alpha 3$ hélix és $\alpha 2$ hélix L5 hurka között van, ami 12 Å távolságnyra helyezkedik el a nukleotidkötő helytől (5. és 6. ábra). Az L5 hurok jelenléte közös jellemzője a kinezineknek, azonban ez az egyik legkevésbé konzervált régió. Az L5 hurok hosszában és szekvenciájában lévő különbségek szolgáltatják a kinezin inhibitorok specificitását. A KSP L5 hurka a leghosszabb a kinezinek közül, ez a tulajdonság magyarázattal szolgálhat a monasztrol KSP szelektivitására.



5. ábra: A KSP.MgADP komplex monasztrolkötő zsebének ábrázolása monasztrol távollétében (vörös) és monasztrol-kötött (zöld) állapotban. A kötőzsebet a monasztrol kötése után a Trp127, Arg119 és Tyr211 oldalláncok fedik le. A $\alpha 2$ hélix helyzete változatlan marad, az $\alpha 3$ hélix eltolódik tengelye mentén 1 Å távolságnyt (Yan és mtsai, 2004).



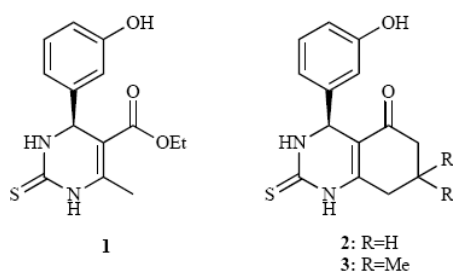
6. ábra: A monasztrol kötőzsebének 20 aminosav-oldallánca

A monasztrol kötése lokális és disztális konformáció-változásokat okoz a motordomén szerkezetében. A disztális konformáció-változások a nukleotidkötő és a központi β -redő magot kivéve megfigyelhetők a motordomén szerkezetében, így a switch I és switch II aktívhely-hurkokban, valamint a nyakrégióban is. A nyakrégió felelős az erő kifejtő lépés kivitelezéséért. A KIF1A kinezin kristályszerkezetéből megállapítható, hogy az AMP-PCP

(ATP-analóg) kötésekor a nyakrégió dokkolt (a motordoménhez rögzített), míg ADP-kötött állapotban nem-dokkolt állapotban van. Összehasonlítva a KSP és KIF1A nyak régióinak szerkezetét, arra a megállapításra jutottak, hogy a monasztrol és ADP kötése a nyakrégió dokkolt állapotát eredményezi (Yan és mtsai 2004).

Annak mechanizmusa, hogy ezek a konformáció-változások hogyan függenek össze az ATP-áz ciklussal illetve milyen módon gátolják az erő kifejtő lépést, még nem teljesen tisztázott. Cochran és munkatársai a monasztrol gátló mechanizmusával kapcsolatban arra a megállapításra jutottak, hogy a monasztrol olyan abnormalis mikrotubulus-KSP komplexet eredményez, amely nem képes a mikrotubuluson való elmozduláshoz szükséges erő generálására. Megállapításra került az is, hogy a monasztrol ATP-un kompetitív gátlószer, mely az ADP-felszabadulás sebességét lassítja (Cochran és mtsai, 2006).

Habár a monasztrol rengeteg KSP inhibícióval kapcsolatos vizsgálatban szerepet kap, nem tekinthető hatékony inhibítornak ($IC_{50}=30\mu M$). A hatékonyabb gátlás érdekében változtatásokat hajtottak végre a monasztrol szerkezetén. Úgy találták, hogy azok az analógok, amelyek fuzionált biciklikus magot tartalmaztak, tízszer nagyobb hatékonyságot mutattak. A gem-dimetil csoport jelenléte is jelentősen csökkentette az IC_{50} értéket (Zhang és mtsai, 2008). (7. ábra)



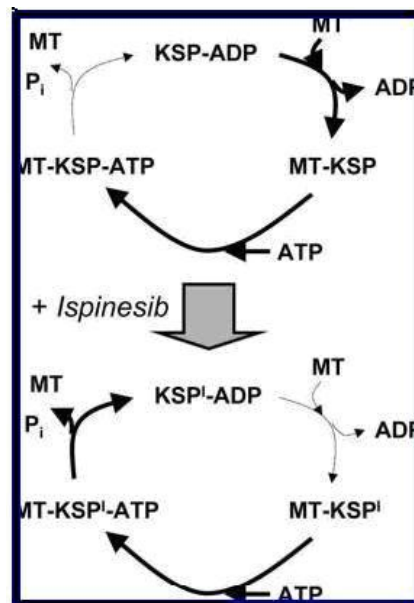
7. ábra. Monasztrol (1.) és analógjai (2.3)

1. $IC_{50}=30\mu M$, 2. $IC_{50}=2\mu M$, 3. $IC_{50}=200\text{ nM}$

2.1.1.2. Az ispinesib

Egy másik L5 hurok-kötő KSP-inhibitor, az ispinesib gátló mechanizmusát is vizsgálat alá vetették. *Steady-state* kinetikai mérések alapján megállapították, hogy az ispinesib ATP-un kompetitív gátló tulajdonsága mellett egy mikrotubulus-kompetitív inhibitor. A vegyület kötése a monasztrolhoz hasonlóan a switch I és switch II régiók strukturális megváltozását okozza. Ezek a régiók a mikrotubulus-KSP komplex kialakulásának szempontjából fontosak. Az ispinesib körülbelül ötször nagyobb affinitással köt a mikrotubulus-mentes KSP-hez, mint

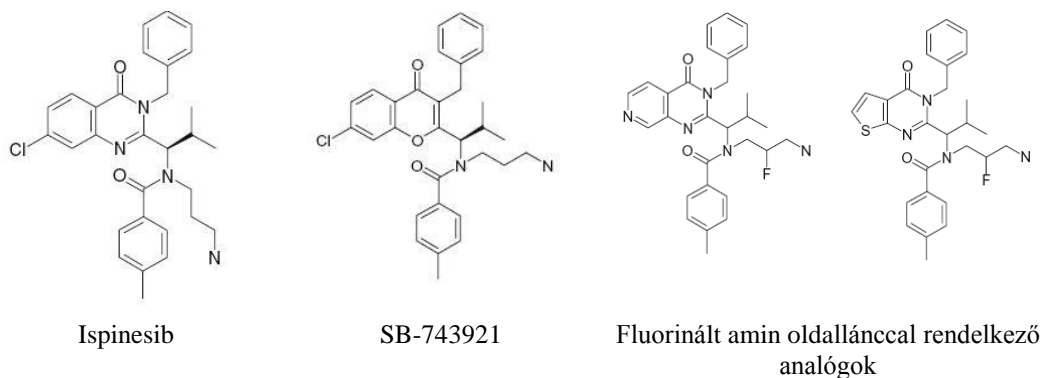
a mikrotubulushoz kötött változathoz, mely megállapítás összefüggésbe hozható az inhibitor mikrotubulus-kompetitív gátló tulajdonságával. Kísérletek arra is fényt derítettek, hogy az ispinesib a monasztrolhoz hasonlóan lassítja az ADP-felszabadulás sebességét. Ez arra enged következtetni, hogy a vegyület a KSP-t ADP-kötött állapotban stabilizálja. Mindemellett a P_i és az mikrotubulus-elengedés sebességét, mely folyamatok az ADP állapot kialakulásához vezetnek, az ispinesib gyorsítja. A monasztrol és az ispinesib hasonló gátlási tulajdonsága arra enged következtetni, hogy a többi L5 hurokkal kölcsönható inhibitor is hasonló mechanizmussal gátolja a KSP működését (8. ábra) (Lad és mtsai, 2008).



8. ábra: Feltételezett kinetikai modell, amely az ispinesib biokémiai mechanizmusát mutatja be. A felső ábrán az látható, hogy ispinesib hiányában a MT-stimulált KSP sebesség-meghatározó lépése az ATP-áz ciklus során a P_i elengedése és a MT-ról történő disszociáció. Ispinesib jelenlétében a KSP ADP-kötött állapotban reked meg, amely kisebb affinitással köti a MT-t. Az ADP állapothoz vezető kinetikai lépéseket az inhibitor gyorsítja, az utána következőket gátolja MT=mikrotubulus (Lad és mtsai, 2008).

Az ispinesib volt az első KSP inhibitor, aminek sikerült belépnie a klinikai fázisú vizsgálatokba. Kémiai szerkezetét tekintve egy quinazolinon maggal rendelkező molekula, mely hetvenezerszer nagyobb affinitást mutat a KSP-hez, mint más kinezinhez. Az ispinesib hatáskörének javítása érdekében a quinazolin mag helyettesítésével is próbálkoznak, melynek eredménye az SB-743921 nevű vegyület, mely nemrég lépett be a II. fázisú klinikai vizsgálatokba. Szintetizálásra kerültek amin oldallánc és benzamid csoport módosított

vegyületek is. Fluorinált amin oldallánccal rendelkező analógok csökkent PgP-mediált effluxot⁴ mutattak (9. ábra) (Huszar és mtsai, 2009).



9. ábra: Ispinesib és analógjai

2.1.1.3 Egyéb ATP unkompetitív inhibitorok

Az ispinesiben és a monasztrolon kívül még számos ATP unkompetitív inhibitor került szintetizálásra. Ezek az inhibitorok szintén a KSP L5 hurkához kötnek. A gátlószerek bővebb ismertetésére nem térek ki. Tájékoztató jelleggel néhány vegyület szerkezeti képletét és nevét táblázatban gyűjtöttem össze (2. táblázat).

2. táblázat: Néhány KSP unkompetitív inhibitor szerkezete (Knight és mtsai 2008 nyomán)

egy tiofén analóg	egy tetrahidroizoquinolin analóg	egy dihidropirrazol analóg
HR22C16	KSP-IA	S-tritil-L-cisztein

⁴ P-glikoprotein ATP-függő transzmembrán efflux pumpa, melynek szerepe van a multidrog rezisztencia kialakulásában.

2.1.2 ATP-kompetitív inhibitorok

A rákellenes anyagok használatában problémát jelent, hogy szerzett rezisztencia léphet fel az velük szemben. Ennek mechanizmusa hasonló az antibiotikum-rezisztencia kialakulásához. Rezisztencia létrejöhet, ha aminosav mutáció történik a célfehérjében, ha életbe lép az efflux mechanizmus vagy olyan enzimeket termel a sejt, amelyek hatástalanítják az inhibitorot (Zhang és mtsai, 2008.).

A DV130V mutáns sejtekben L5 hurok mutáció következtében az ATP-unkompetitív KSP inhibitorok nem tudnak hatékony módon gátló hatást kifejteni. (Parrish és mtsai, 2007).

Ebből következően könnyen belátható, hogy szignifikáns a jelentősége annak, hogy eltérő kötő helyhez kapcsolódó KSP inhibitorok is azonosításra kerüljenek. Az alább bemutatott KSP inhibitorok a kinetikai mérések alapján ATP-kompetitív módon gátolták az enzimet. Ezeknek az inhibitoroknak az azonos gátlási módja azonban nem feltétlenül jelenti azt, hogy a kötőhelyük is megegyezik.

2.1.2.1. Biarilok

A biaril analógok közül a GSK-1 és GSK-2 (10. ábra) vegyületek antitumor aktivitásának és kötési mechanizmusának feltérképezésére irányuló vizsgálatát ismertetem a következőkben. *Steady-state* vizsgálatokból megállapításra került, hogy ATP-kompetitív és mikrotubulus-unkompetitív gátlószerekről van szó. A GSK-1 és a GSK-2 is gátló hatást mutatott a DV130V és A133D mutáns L5 hurok KSP-t tartalmazó sejtekben. A GSK-1 IC_{50} értéke az iszinesib rezisztens (L5 mutáns) sejtekre kisebb értéket mutatott, mint vad típusú KSP-t tartalmazó sejtek esetén. Ez az észrevétel összefüggésben lehet azzal, hogy a mutáns enzim ATP-re vonatkozó K_m értéke magasabb, mint a vad típusúé. Ez a tény azt jelentheti, hogy a biaril származékok hatékonyabban tudják az ATP-kötést megakadályozni a mutáns enzimet tartalmazó sejtekben.



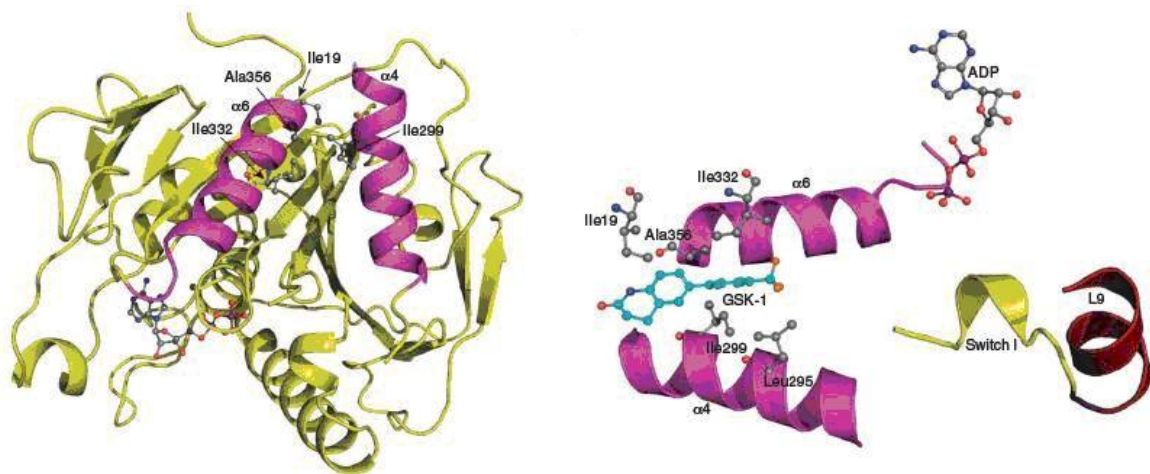
10. ábra: A GSK-1 és GSK-2 szerkezete

Krisztallográfias eljárással nem lehetett megállapítani a biarilok kötőzsebének helyét. Ennek okán biaril rezisztens sejtek KSP szekvenciáit vizsgálták meg ahhoz, hogy kiderítsék a kötőhely lokalizációját. A mutációk nem lineárisan követték egymást, azonban ha a három dimenziós motordomén szerkezetet nézték, látható volt, hogy a mutációk az $\alpha 4$ és $\alpha 6$ hélixek aminosavait érintették.

Vizsgálatok kimutatták, hogy egy kis zseb helyezkedik el a switch II $\alpha 4$ és $\alpha 6$ hélicei között. A GSK-1 valószínűleg a trifluorometil csoportján keresztül lép interakcióba a zsebben található hidrofób Phe102, Leu266, Leu295, Ile332 és Tyr352 aminosavakkal (11. ábra).

A KIF1A kinezin ATP-hidrolízis során megjelenő átmeneti állapotait vizsgáló kísérletekből azt feltételezik, hogy az $\alpha 4$ hélix konformáció-változáson megy keresztül a nem-dokkolt, ADP-kötött és a dokkolt, ATP-kötött állapotok között. Az $\alpha 4$ hélix mozgása és $\alpha 6$ hélixszel való interakciói tekinthetőek a kulcs konformációs változásoknak a nyakrégió dokkolásának kiváltásában. Ezért az $\alpha 4$ hélixet relé hélixnek is szokták nevezni. A biaril kötésével az $\alpha 4$ - $\alpha 6$ régióban az enzim nem tudja az ATP hidrolíziséhez szükséges konformáció-változásokat végrehajtani.

Habár a biaril származékok funkcionálisan ATP-kompetitív módon fejtik ki gátló hatásukat, a kötőhely eltér az ATP kötőzsebtől. Farmakológiai célpontnak tekinthető enzim esetében ez a fajta gátlási mechanizmus egyedülállónak tekinthető (Luo és mtsai, 2007).



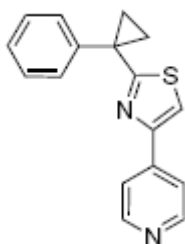
11. ábra: A GSK-1 kötése az $\alpha 4$ - $\alpha 6$ hélixek közé (Luo és mtsai 2007)

2.1.2.2. Tiazolok

A tiazol-analógok kompetitívnak bizonyultak ATP-vel szemben és unkompetitívnak a mikrotubulusokkal szemben az ATP-áz vizsgálatok során. Az analógok IC_{50} értékeinek összevetése alapján az analógok aril csoportjának változtatása volt a kulcs a hatás növeléséhez. Az egyik új tulajdonsága ezeknek az inhibitoroknak összehasonlítva az L5 hurok kötő gátlószerekkel az, hogy ha növeljük a koncentrációjukat, az növeli a KSP affinitását a mikrotubulushoz. A tiazol kötése után tiazol-KSP-mikrotubulus komplex jött létre, ellentétben az unkompetitív gátlószerekkel, amelyeknél inhibitor-nukleotid-KSP komplex volt megfigyelhető.

A legvalószínűbb lehetőségnek az tűnik, hogy a tiazolok a KSP ATP-kötő árkába kötnek, habár a kinetikai adatok azt is támogathatják, hogy a biaril analógokhoz hasonlóan egy másik alternatív zsebbe illeszkednek, ami más úton akadályozza meg az ATP-kötést.

Az ADP- és KSP-kötés kristályszerkezetének analízise fényt derített arra, hogy az ADP adenin bázisán keresztül π - π kölcsönhatásba lép a P-hurok Phe113 oldalláncával, a foszfát farok pedig a nukleotidkötő zseb poláris része felé ékelődik be. A ribóz gyűrű és a kötőzseb között nem figyelhető meg interakció. Annak felbecslésére, hogy a tiazol mennyire alkalmas az ADP helyettesítésére, a tiazol egyik analógjának (12. ábra) számos konformációját hozták fedésbe az ADP megfelelő szerkezetével.



12. ábra: tiazol-analóg

Az analóg tartalmazta a legszükségesebb csoportokat az ADP helyettesítésére. Dokkolásos módszerrel az analógot a KSP ADP-kötőzsebébe illesztve azt találták, hogy az analóg ciklopropil és fenil gyűrűje az ADP adenin gyűrűjével, a közepen elhelyezkedő tiazol gyűrűje az ADP ribóz csoportjával, míg a pirimidin oldallánca az ADP foszfátcsoportjával

feleltethető meg. Ez a megfigyelés magyarázattal szolgálhat az ATP-kompetitív kinetikai adatokra.

A tiazolok hatását megvizsgálták más ATP-áz enzimekre is. Kinázok esetén nem mutattak gátló hatást, mely megállapítás összefüggésbe hozható a két enzim különböző nukleotid kötő mechanizmusával: a kinázok donor-akceptor-donor interakción keresztül lépnek kapcsolatba az ADP-vel.

Érdekes az a tény, hogy bár az ATP-kötőzseb magasan konzervált a kinezinek között, a tiazolok szignifikáns szelektivitást mutattak a KSP ATP-kötőzsebe iránt. Biztos magyarázat még nincs a jelenségre. Elképzelhető, a zseb kevésbé konzervált oldalláncai, például az egyik glutamin felelős a szelektivitásért. Mutagenézis vizsgálatok kimutatták, hogy a glutamin aminosav megváltoztatása hatással volt a tiazolok kötési affinitására. Mivel a KSP egyik ortológ változatán, az *A. nidulans* BimC enzimén nem mutatott aktivitást a tiazol, ezért lehetséges, hogy a két enzim közti nem konzervált oldalláncok lehetnek a fő kapcsolódási partnerek.

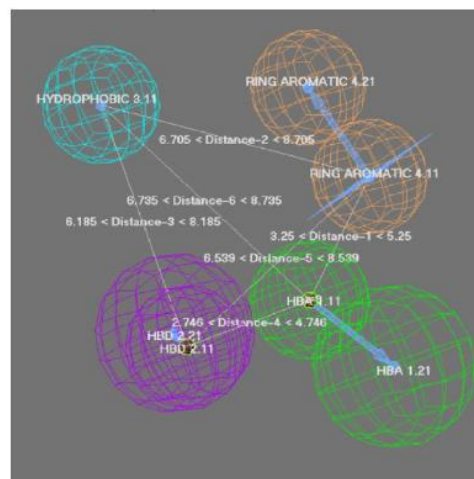
Az L5 hurok-kötő inhibitor jelenlétében tiazol analóg nem tudott az enzimhez kötni. Ebből arra lehet következtetni, hogy az L5 inhibitor kötése olyan konformáció-változásokat indukál az ATP-kötőzsebben, melyek ellehetetlenítik a tiazol kötését. Ezek az eredmények azt indítványozzák, hogy az inhibitor kötése nagyon érzékeny az enzim strukturális változásaira. Egyelőre nincs biztos magyarázat a kötés mechanizmusára és szelektivitás eredetére; ennek megállapításához még további szerkezeti illetve mutagenézis vizsgálatok szükségesek.

A tiazolok antitumor aktivitását megvizsgálták A2780 rákos sejtvonalakon. A KSP inhibitorokra jellemző monoasztrális fenotípus kép és mitózis-megállás megfigyelhető volt a sejteken. Megjegyzendő, hogy bár a monoasztrális mikrotubulus-kromoszóma elrendeződés arra enged következtetni, hogy a mitózis-megállás a KSP inhibíciójának következménye, az is lehetséges, hogy más körülmények között az allosztérikus inhibitoroknál tapasztalt fenotípus képtől eltérő eredményeket tapasztalhatunk (Rickert és mtsai, 2008).

2.2. KSP inhibitorok farmakofórijának megállapítása

Liu és munkatársai 25 ismert unkompetitív KSPi szerkezetét analizálva próbálták megállapítani a KSP inhibitorok farmakofóriját. Az alapfeltevések közé tartozott az, hogy minden vegyület ugyanahhoz a kötőhelyhez kössön, nagyjából ugyanolyan módon, valamint

azok a vegyületek, amelyek több interakciót létesítettek a kötőhellyel, aktívabbak legyenek mint azok, amelyek kevesebbet. A felhasznált 25 vegyület eltérő aktivitás-értékeket mutatott. A legjobb farmakofór hipotézis szerint a farmakofór négy farmakofór csoportból tevődik össze: egy hidrogén kötés donorból, egy hidrogén kötés akzeptorból, egy aromás gyűrűből, valamint egy hidrofób csoportból (13. ábra). Ezek az eredmények fontos információkat szolgáltathatnak a KSP inhibitor fejlesztésében és optimalizációjában, mely inhibitorok akár rákellenes terápiában is felhasználásra kerülhetnek (Liu és mtsai 2006).



13. ábra: KSP inhibitorok farmakofór szerkezete: kék: hidrofób csoport, narancssárga: aromás gyűrű, lila: hidrogén kötés donor, zöld: hidrogén kötés akceptor (Liu és mtsai, 2006)

2.3. A KSP-inhibíció által kiváltott sejthalál mechanizmusa

A sikeres tumorellenes terápia feltétele az is, hogy az inhibíció által kiváltott apoptózis folyamatát minél jobban megértsük. Ezáltal könnyebben tudjuk azokat a rákos sejtvonalakat kiválasztani, amelyek esetében a terápia sikeres lehet, illetve az esetlegesen fellépő rezisztencia mibenlétét is jobban átláthatjuk, ellene lépéseket tehetünk.

A mitokondriális vagy másnéven belső (*intrinsic*) halál útvonal az egyike a két fő kaszpázfüggő apoptózis útvonalnak, amit antitumor aktivitású szerek aktiválni képesek. A mitokondriális apoptózis útvonal esszenciális szereplője a BclXL fehérje, amely a Bcl-2 antiapoptotikus fehérje család tagja. Alapállapotban a BclXL fehérje a mitokondriumok külső falában gátolja a citokróm-c kiáramlást egy ioncsatornára hatva. Sejtkárosodás hatására

azonban a proapoptotikus Bax fehérje gátolja a BclXL fehérjét, így felszabadul a citokróm-c, ami az Apof-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) fehérjével kapcsolódva apoptozómát képez. Az apoptozóma aktiválja a kaszpáz-kaszkádot. A kaszpázok képesek a sejt fehérjéinek a hasítására, a proteolízisre, ami végül apoptózishoz vezet.

A halálreceptorok, mint a Fas/CD95 és a TNF által mediált külső (*extrinsic*) halál útvonal a másik fontos kaszpázfüggő útvonal, aminek működését antitumor szerek váltják ki. A Fas receptor köti a Fas-ligandumot (FasL). A Fas-ligandum aktiválja a kaszpáz-kaszkádot, mely a Bax fehérjén keresztül elindítja a mitokondriális apoptózis útvonalat is.

A tumorszuppresszor p53 fehérje a kulcsfaktora a belső apoptózis útvonalnak: képes olyan proapoptotikus fehérjék expresszióját szabályozni, amelyek a Bax fehérje működését aktiválják. Ilyen fehérje például a BH-3. A p53 a külső útvonalat is szabályozza a halál receptorok kifejeződésének aktiválásával (Tao és mtsai 2007).

Vijapurkar és munkatársai a monasztrol-indukálta mitózis-megállásra kiváltott sejtválaszt vizsgálták meg különböző rákos sejtvonalakban (Vijapurkar és mtsai, 2008). Megvizsgálták a mitokondriális apoptózis útvonalakban fontos funkciót betöltő fehérjék, valamint a külső halál receptor útvonalakban szereplő enzimek válaszát a sejt monasztrollal való kezelésének hatására. A kísérletben HeLa, A549 valamint A2780 tumoros sejtvonalakat használtak fel.

A HeLa sejtekkel végzett megfigyelések azt mutatták, hogy a monasztrol kezelés mitokondrium-károsodáshoz és kaszpáz-aktivációhoz vezet. A mitózis-megállás után az apoptózis úgy megy végbe, hogy a sejt nem lép ki a mitózis fázisból.

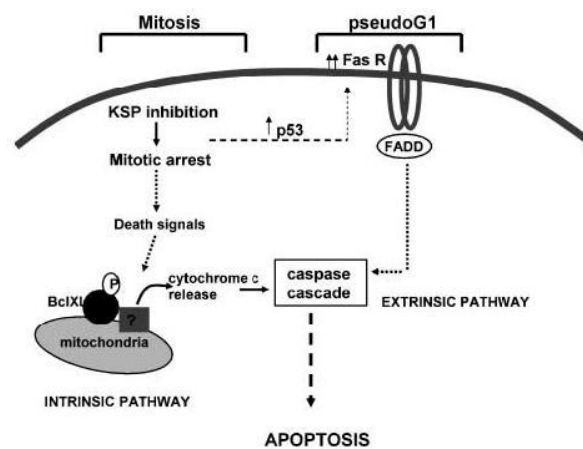
Az A549 nem-kissejtes tüdőrák sejtvonalakban ezzel ellentétben azt tapasztalták, hogy a sejt a mitózis megállása után kilép a mitózisból és G₁-szerű állapotba kerül anélkül, hogy a mitokondriális halál útvonalat aktiválná. Tehát ez a sejtvonal-típus rezisztens a monasztrollal szemben.

A KSP inhibíció hatását megvizsgálták a BclXL fehérjére is HeLa sejtekben. Úgy találták, hogy az enzim foszforilálódott az inhibíció hatására, amely folyamat aktiválta a belső apoptózis útvonalat.

Megállapításra került az is, hogy a BclXL kulcsszerepet játszik a monasztrol-indukálta sejthalál elleni rezisztencia kialakulásában. Ehhez A549 monasztrol-rezisztens sejtvonalakkal végeztek kísérleteket. Ezekre a sejtekre BclXL fehérje túlexpresszáldása jellemző. Ha BclXL szintjét géncsendesítés útján csökkentették és a sejteket monasztrollal kezelték, mitokondrium-károsodás kiváltotta apoptózist tapasztaltak.

A külső halál útvonal tagjainak szerepét is megvizsgálták a kísérlet során. Azt tapasztalták, hogy KSP inhibíció hatására a Fas-receptorok száma megnövekedett a membránban. Ha Fas-receptor aktiváló antitesttel kezelték a sejtet monasztrol mellett, az szignifikánsan megnövelte a kaszpáz aktivációt. Ez azt a feltevést indítványozza, hogy a KSP inhibítor aktiválta Fas-receptor kifejeződés érzékenyíti a sejtet a Fas receptor agonisták okozta apoptózis bekövetkezésére. A p53 fehérje szerepe is döntőnek bizonyult a Fas receptorok kifejeződésében, hiszen a p53 depléciós sejtekben nem volt a hatás megfigyelhető (Vijapurkar és mtsai, 2007).

A fent leírt eredmények összegzése a 14. ábrán látható.



14. ábra: A KSP-inhibíció indukálta apoptózis útvonalainak modellje. A BclXL gátlása vagy a Fas receptor aktivációja növeli a KSPi kiváltotta sejthalál hatékonyságát.

KSP inhibition- KSP inhibíció, mitotic arrest-mitózis megállás, death signals-halál útvonali jelek, mitochondria-mitochondrium, cytochrome c release-citokrómn c kiáramlás, caspase cascade-kaspáz kaszkád, intrinsic pathway-belső útvonali, extrinsic pathway-külső útvonali (Vijapurkar és mtsai, 2007)

Tao és munkatársai is végeztek kísérleteket a KSP inhibíció kiváltotta apoptózis mechanizmusának felderítésére. A KSP inhibíciót KSP-IA nevű dihidropirrol származékkal váltották ki. Az apoptózis útvonali tagjai közül, a Bax és a p53 fehérjék szerepét vizsgálták meg. Azt állapították meg, hogy a Bax fehérje poszttranszlációs módosítások útján, a kaszpázoktól független módon aktiválja a belső apoptózis útvonali. Úgy találták, hogy a p53 fehérje szerepe nélkülözhető a mitotikus orsó ellenőrzési pontjában, hiszen a KSP inhibíció indukálta apoptózis végbement p53 hiányos sejt vonalakban is. Ebből arra lehet következtetni, hogy a KSP inhibítorok használatával a p53-hiányos tumorokat is el lehet pusztítani (Tao és mtsai, 2007).

2.4. Klinikai tapasztalatok

A KSP inhibitorok a rákos megbetegedések elleni harc fontos eszközei lehetnek, köszönhetően széles felhasználhatósági spektrumuknak és alacsony toxicitásuknak. Mivel ezeknek a vegyületeknek nincsen hatása a mikrotubulusokra, ezért a neuropátiával, mint káros mellékhatással nem kell számolnunk.

Jelenleg hét KSPi-t vizsgálnak I. vagy II. fázisú klinikai tesztekben (3. táblázat) és számos van fejlesztés alatt. Az MK-0731 nevű szer státusza már inaktív, a többi azonban még aktív kísérleti szakaszban van (Huszar és mtsai, 2009). A tesztelések során a dózis limitáló tényezőknek a következő mellékhatások bizonyultak: mieloszuppresszió⁵, neutropénia⁶, leukopénia, AST és ALT⁷ szint emelkedés, hiperbilirubinémia⁸ és hiponátrémia⁹.

3. táblázat. KSP inhibitorok klinikai használata (Huszar és mtsai, 2009)

Vegyület neve	Cég neve	Klinikai fázis	Dózis limitáló mellékhatások	Státusz
SB-715992	Cytokinetics	2	Neutropénia, leukopénia	Aktív
SB-743921	Cytokinetics	2	Neutropénia, hyponátrémia, máj funkció zavar	Aktív
MK-0731	Merck	1	Neutropénia, máj funkció zavar	Inaktív
AZD4877	Astrazeneca	2	Neutropénia	Aktív
ARRY-520	Array Biopharma	2	Nem elérhető adat	Aktív
EMD534085	Merck-Kgaa	1	Nem elérhető adat	Aktív
LY2523355	Eli Lilly	1	Nem elérhető adat	Aktív

Az ispinosib (SB-715992) volt az első kinezin inhibitor, melynek sikerült belépnie a klinikai tesztelés fázisába. Jelenleg a leginkább kutatott KSP inhibitor. Az I. fázisú tesztekben szolid tumoros betegeken vizsgálták a hatását. A leggyakoribb mellékhatások között a fáradékonyság, émelygés, hányás, vérképző-rendszeri zavarok szerepeltek. A leginkább biztató hatást előrehaladott mellrákos betegek esetében érték el, esetükben már II. fázisú

⁵ mieloszuppresszió: a csontvelő csökkent vörsejt- és vérlemezke-termelése

⁶ neutropénia: a vérben keringő neutrofil fehérvérsejtek számának lecsökkenése

⁷ AST és ALT: aszpartát aminotranszferáz és alanin aminotranszferáz, májfunkció jellemzésére szolgáló enzimek

⁸ hiperbilirubinémia: magas bilirubinszint

⁹ hiponátrémia: a vér nátriumtartalmának kóros csökkenése

tesztek is elkezdődtek. A tumorból vett biopsziából megállapításra került a KSP inhibíció ténye, hiszen a sejtekben monoasztrális fenotípust mutattak ki (Knight és Parrish, 2008).

Melanómás esetekben, habár a KSP túlzott expressziója miatt attraktív célpontnak tűnt, nem sikerült kedvező hatást kiváltani, ezért a további vizsgálatokat leállították. Egyéb tumoros megbetegedések esetén nem sikerült szignifikáns eredményeket elérni (Sarli és mtsai, 2008).

Egyelőre úgy tűnik, hogy az ispinesib monoterápiás használata nem tekinthető hatékony kemoterápiás kezelésnek, ezért más citotoxikus vegyületekkel együttes hatását is vizsgálat alá érdemes vonni. Már léteznek tanulmányok az ispinesib és más hagyományos antitumor aktivitású szerek (carboplatin, capecitabin, docetaxel) együttes alkalmazásáról. Docetaxellel történő kombinálás során a KSPi dózist 50 %-kal csökkenteni kellett. A dózis limitáló mellékhatásként itt is a vérképzési zavarokkal kellett számolni (Bergnes és mtsai, 2008).

Második generációs KSP inhibitorok közül az SB-743921 hatását nem-Hodgkin limfómás, az AZD4877 és az ARRY-520 hatását leukémiás betegeken tesztelik (Sarli és mtsai, 2008).

Az inhibitorok gyermekgyógyászati alkalmazása is vizsgálat alatt van, a maximum tolerálható dózis hasonló értékű mint felnőttek esetében.

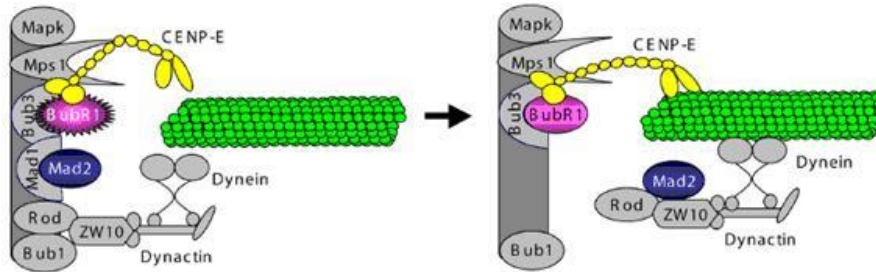
Kihívást jelent a KSPi fejlesztésben a multidrog rezisztencia kialakulásának megelőzése. A P-glikoprotein (PgP) pumpa megjelenése a membránban efflux mechanizmushoz vezet. A klinikai tesztek során kimutatható ispinesib rezisztencia is ennek köszönhetően alakult ki (Sarli és mtsai, 2008).

A KSPi-k klinikai használatát továbbfejlesztése továbbra is folyamatban van. Az eddigi vizsgálatok arra utalnak, hogy ezek az inhibitorok más citotoxikus anyagokkal kombinálva kerülhetnek majd orvosi használatra.

3. A Centroméra asszociált protein-E

A KSP-hez hasonlóan a CENP-E is plusz vég irányultságú motorfehérje, azonban a KSP-vel ellentétben dimer szerkezetű. A molekula N-terminális része tartalmazza a motordomént. A C-terminális domén nem csak a kinetochoron való lokalizációért felelős, hanem itt hat kölcsön a BubR1 fehérjével, amely mitózis-ellenőrző jelpálya egyik kulcsszereplője. A BubR1 komplexet képez olyan proteinekkal, mint a Cdc20, Bub3 valamint Mad2. Az aktív állapotú BubR1 az anafázis elősegítő komplex (APC/C^{cdc20}) securinra és

cyclin B-re ható ubiquitin ligáz aktivitását gátolja, vagyis amíg nincs minden kinetochór mikrotubulushoz kötve, addig a sejtciklus során nem engedi az anafázisba való továbblépést (15. ábra).

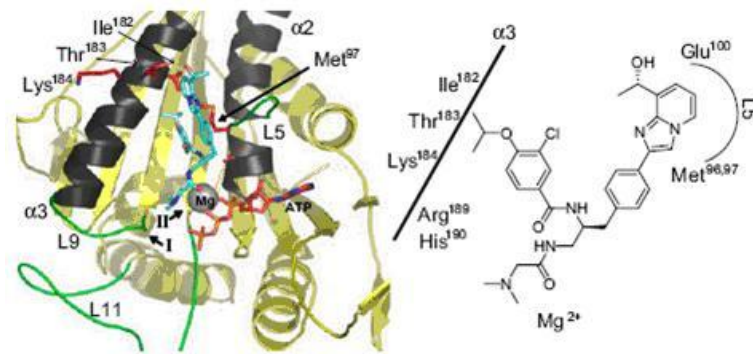


15. ábra: Jobb oldali ábra: ha a CENP-E nem csatlakozik a mikrotubulushoz, a BubR1 aktivált állapotban marad, a sejt nem léphet anafázisba. Bal oldali ábra: Ha a CENP-E a mikrotubulushoz köt, az a mitózis ellenőrző pontjának azt jelenti, hogy a mitózis folytatódhat, a sejt anafázisba léphet (Mao és mtsai, 2005).

Habár a CENP-E funkciója a mitózis ellenőrző pontjában még nem teljesen tisztázott, feltételezik, hogy kulcsszerepet játszik a folyamatban. A CENP-E depléciója sejtciklus-késést okozott a sejtekben, valamint a kromoszómák sorba rendeződése sem történt meg. Ebből arra következtethetünk, hogy az enzim a fontos szerepet játszik a metafázisban a kromoszómák felsorakoztatásában is. A CENP-E inhibitor kifejlesztését az a tény is szorgalmazta, hogy részleges CENP-E funkcióvesztéses egér törzsekben kisebb volt az esélye a rák kialakulásának (Wood és mtsai, 2010).

A szakirodalom szerint a CENP-E, vagyis centroszóma asszociált protein-E egyik inhibitorának, a GSK923295A nevű vegyületnek már sikerült eljutnia a preklinikai tesztelés fázisába (Sudakin és Yen, 2007).

A GSK923295 a CENP-E egy potens és specifikus inhibitora. Mutagenézis vizsgálatokkal sikerült analizálni a kötőhelyét, amely mint kiderült analóg a KSP ATP-un kompetitív kötő helyével, vagyis a $\alpha 2$ és $\alpha 3$ hélixek között helyezkedik el (16. ábra).



16. ábra: A GSK923295 (kék színnel jelölve) feltételezett kötési módja a CENP-E motordoménjéhez. A kötőzseb az $\alpha 2$ és $\alpha 3$ hélixek között van az L5 hurk szomszédságában. A switch I és switch II régiók római számmal vannak jelölve. Az L5, L9, és L11 hurkok zöld színűek. Jobb oldalt a sematikus ábrázolás látható.

Azok KSP inhibitorok, melyek az enzim L5 hurkába kötnek, drámaian lassítják az ADP-felszabadulás sebességét. Annak ellenére, hogy a kötőhelye hasonló, a GSK923295 eltérő módon gátolja az enzimet. Az inhibitor a Pi-elengedés sebességét csökkenti, valamint olyan konformációba dermeszti az enzimet, mely szorosan köt a mikrotubulushoz.

A specifikus mechanizmus, mellyel a GSK923295 gátolja a Pi-felszabadulást, kapcsolatba hozható a switch I, switch II és MT kötő hurkok megfelelő konformáció-változásaival. Azok a szerkezeti komponensek, melyek az γ -foszfát érzékeléssel összefüggésbe hozhatóak, evolúciósan konzerváltak a kinezinek között. Más kinezinekkel végzett korábbi vizsgálatokból már kiderült, hogy az ATP hidrolízise és a γ -foszfát felszabadulása kapcsolatban van a switch I régió L9 hurkával. Ennek konformáció-változása pedig hatással van a switch II-re, vagyis a magas és az alacsony affinitással kötött mikrotubulus állapot közti váltásért felelős régióra. Ezek alapján feltételezhető, hogy a GSK923295 kötésével, vagyis a Pi elengedésének gátlásával az enzim a szorosan mikrotubulus-kötött állapotban marad.

A GSK923295 gátlásának módjából arra következtethetünk, hogy a CENP-E motordoménjének és a mikrotubulusnak a szoros kötése nem elégséges jel a mitózis ellenőrző pontjának ahhoz, hogy a mitózis tovább folytatódjon. Ezért okoz az inhibitor mitózis-megállást a sejtekben.

A GSK923295 antiproliferatív és proapoptotikus hatását *in vitro* 237 sejtvonalon és 11 tumoros szövettenyészetben tesztelték. Malignus és nem malignus mellrákos sejtvonalakat vizsgálva azt állapították meg, hogy a bazális szubtypusú tumoros sejtek voltak a legérzékenyebbek, míg a nem malignus sejtek rezisztensnek bizonyultak az inhibitor hatásaival szemben (Wood és mtsai 2010).

A mitózisban még számos kinezin játszik szerepet, amelyek gátlása potenciálisan felhasználható lehet a rákos sejtek szaporodásának megállítására (1. táblázat). Ennek ellenére a szakirodalom szerint egyelőre a KSP és CENP-E kinezinek inhibitorain kívül, más mitózisban részt vevő kinezin inhibitorának még nem sikerült eljutnia a klinikai használatban való tesztelés fázisába.

Következtetés

A rákos betegségek közös jellemzője a sejtek korlátlan szaporodása. A betegség elleni küzdelem megoldása lehet az, ha a kóros proliferációt gátoljuk. A mitotikus kinezinek ideális célpontok lehetnek a tumorsejtek szaporodásának gátlásában több okból kifolyólag is.

Egyrészt ezek a kinezinek osztódó sejtekben vannak jelen, ezért gátlásukkal más sejtekre nem gyakorolunk hatást, másrészt többféle tumor esetén kimutattak mitotikus kinezin (KSP) túlexpresszáldást. (Huszar és mtsai, 2009). Ezek a megállapítások azt indítványozzák, hogy specifikusan hathatunk rákos sejtekre mitotikus kinezin inhibitorok alkalmazásával.

A mitotikus kinezinek közül a KSP inhibitorok orvosi használatának tesztelése mondható a leginkább széleskörűnek. A klinikai tesztekben egyelőre nem sikerült teljes hatást érvényesíteni KSP inhibitorok alkalmazásával. Ebből azt a megállapítást vonhatjuk le, hogy a hatékonyabb terápiás alkalmazhatóság eléréséhez egyéb citotoxikus anyagokkal való kombináció jelentheti a megoldást. A hatékonyság javításának másik lehetséges területe lehet az inhibíció kiváltotta apoptózis mechanizmusának további vizsgálata, valamint olyan apoptózisban részt vevő molekulák azonosítása, amelyeknek működését befolyásolva eredményesebben válthatjuk ki a rákos sejtek elpusztulását. A sejthalál folyamatának pontosabb ismerete segíthet azoknak a tumortípusoknak a kiválasztásában, melyek esetén a KSP inhibícióval az apoptózis kiváltható (Vijapurkar és mtsai, 2007). Emellett fontos területnek tekinthető az eltérő kötőhelyhez kapcsolódó KSP inhibitorok azonosítása, hiszen így nagyobb eséllyel kerülhetjük el a célpont enzim mutációiból eredő rezisztencia problémáját (Luo és mtsai, 2007).

A CENP-E gátlásának, és az inhibíció okozta apoptózis mechanizmusának mélyebb megismerése még további vizsgálatokat igényel. A rákos sejtvonalokon végzett kísérletek egyelőre azt mutatják, hogy a CENP-E egy potenciális rákellenes célfehérjének tekinthető, ezért érdemes további kutatásokat végezni a témában.

Összefoglalás

A mitotikus orsó, mint rákellenes célpont már régóta ismert. A hagyományos antitumor aktivitású szerek a mitotikus orsó mikrotubulusaira gyakorolnak hatást. A mikrotubulusok azonban esszenciális szerepet töltenek be a neuronok életében is, ezért neuropátiával mint mellékhatással számolni kell használatuk esetén. Az utóbbi években a mitotikus kinezinnek, mint alternatív antimitotikus célpontok a kutatások középpontjába kerültek. Eddig 11 olyan kinezint sikerült azonosítani, melyek különböző feladatokat látnak el a mitózis folyamán.

A Kinesin Spindle Protein nevű fehérje tekinthető a leginkább kutatott mitotikus kinezinnek. Ez a fehérje a mitózis korai szakaszában aktív, mikor a kétpólusú mitotikus orsó szerveződik. A KSP inhibitorokkal kezelt sejtek mitotikus orsójának fenotípusára monoasztrális elrendeződés jellemző. A KSP gátlásával megvalósítható a sejtek mitózisának megállása, valamint apoptotikus folyamatok kiváltása.

Az első potenciális KSP inhibitor felfedezése óta (Mayer és mtsai, 1999) nagy az érdeklődés az újabb és újabb gátlószerek felfedezése iránt. Ennek következtében rengeteg inhibitor került szintetizálásra az elmúlt évek folyamán. Az inhibitorok között megkülönböztethetünk ATP-unkompetitív és ATP-kompetitív inhibitorokat. A gátlószerek eltérő tulajdonságai megnövelik a KSP gátlásának a rákellenes terápiában való hasznosíthatóságát.

Számos KSP inhibitor hatását vizsgálják már I. és II. fázisú klinikai tesztekben. Habár a vegyületek szerkezetileg eltérnek egymástól, a gátlási mechanizmus és az L5 allosztérikus kötőzsebhez való kapcsolódás tekintetében megegyeznek egymással. A klinikai vizsgálatok során az ispinesib szolgáltatva a leginkább biztató eredményeket. Előrehaladott mellrákos betegek esetében sikerült eddig a legjobb hatást elérni.

Az utóbbi időszakban a KSP mellett előtérbe kerültek egyéb mitózisban szerepet játszó kinezinnek is, melyek onkológiai szempontból ideális tulajdonságokkal bírnak. A CENP-E kinezin mitózisban betöltött szerepe a metafázisos kromoszómák valamint a mitotikus ellenőrző pont tagjaként érhető tetten. A CENP-E egyik inhibitorának a GSK923295 nevű vegyületnek a hatása biztatónak bizonyult a preklinikai vizsgálatok során számos tumoros sejtvonal esetében, ezért érdemes további vizsgálatokat végezni a témában.

Summary

The mitotic spindle has long been identified as a target against cancer, and is affected by regular anti-tumor agents. Microtubules, however, also play an essential role in the life of neurons, thus neuropathies are to be expected as side-effects when antimitotic agents are used. During recent years mitotic kinesins have become the focus of research for antimitotic targets. Up until now 11 mitotic kinesins have been identified with different roles in mitosis.

The protein named Kinesin Spindle Protein (KSP) can be regarded as the most investigated mitotic kinesin. This protein is active in the early phase of mitosis when the bipolar mitotic spindle is being organised. Monoastral phenotype is typical for the mitotic spindles of cells treated with KSP inhibitors. Mitotic activity of cells can be halted as well as apoptotic processes can be triggered by inhibiting KSP.

Ever since the discovery of the first KSP inhibitor (Mayer et al, 1999), there has been a great interest into the research of new inhibitory substances. As a consequence, a vast number of inhibitors have been synthesised in recent years. Among these we can differentiate between ATP-competitive and ATP-uncompetitive inhibitors. The different properties of these inhibitory substances may increase the chance of useful application of the inhibition of KSP in the therapy against cancer.

The effect of many KSP inhibitors are being examined in first and second stage clinical trials. Although these compounds vary from one another in structure, their mechanism with which they inhibit and their binding to the L5 allosteric binding site is identical. During these trials, ispinesib showed the most promising result. The best effect was achieved in patients with advanced breast cancer.

Recently other kinesins involved in mitosis have been mentioned beside KSP, which have ideal oncological properties. The effect of the kinesin CENP-E in mitosis can be seen in the orientation of metaphasic chromosomes and as the part of the mitotic checkpoint. The effect of the compound GSK923295, an inhibitor of the CENP-E, has been promising in preclinical trials in many tumour cell lines, therefore further tests are advised in the topic.

Felhasznált irodalom

1. Duhl DM, Renhowe PA. Inhibitors of kinesin motor proteins--research and clinical progress. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2005;8(4):431-436.
2. Sarli V, Giannis A. Targeting the kinesin spindle protein: basic principles and clinical implications. *Clin Cancer Res* 2008;14(23):7583-7587.
3. Bergnes G, Brejc Katjus, Belmont Lisa. Mitotic Kinesins: Prospects for Antimitotic Drug Targets. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2005. 2005;5:127-145.
4. Sakowicz R, Finer J T, Beraud C, Crompton A, Lewis E, Fritsch A, Lee Y, Mak J, Moody R, Turincino R, Chabala J C, Gonzales P, Roth S, Weitman S, Wood K W. Antitumor Activity of a Kinesin Inhibitor. *Cancer Research* 2004;5(5):3276-3280.
5. Ferenz NP, Gable A, Wadsworth P. Mitotic functions of kinesin-5. *Semin Cell Dev Biol* 2010;21(3):255-259.
6. Sharp DJ, McDonald KL, Brown HM, Mitchinson HJ, Scholey JM, Walczak C, Vale RD The Bipolar Kinesin, KLP61F, Cross-Links Microtubules Bundles of Drosophila Embryonic Mitotic Spindles. *J. Cell. Biol*, 1999, 144 (1), 125-138
7. Huszar D, Theoclitou ME, Skolnik J, Herbst R. Kinesin motor proteins as targets for cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2009;28(1-2):197
8. Mayer TU, Kapoor TM, Haggarty SJ, King RW, Schreiber SL, Mitchison TJ, et al. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science* 1999;286(5441):971-974.
9. Yan Y, Sardana V, Xu B, Homnick C, Halczenko W, Buser CA, et al. Inhibition of a mitotic motor protein: where, how, and conformational consequences. *J Mol Biol* 2004;335(2):547-554.
10. Cochran JC, Gatial JE, Kapoor TM, Gilbert SP. Monastrol inhibition of the mitotic kinesin Eg5. *J Biol Chem* 2005;280(13):12658-12667.
11. Zhang Y, Xu W. Progress on kinesin spindle protein inhibitors as anti-cancer agents. *Anticancer Agents Med Chem* 2008;8(6):698-704.
12. Lad L, Luo L, Carson JD, Wood KW, Hartman JJ, Copeland RA, et al. Mechanism of inhibition of human KSP by ispinesib. *Biochemistry* 2008;47(11):3576-3585.
13. Knight SD, Parrish CA. Recent progress in the identification and clinical evaluation of inhibitors of the mitotic kinesin KSP. *Curr Top Med Chem* 2008;8(10):888-904.

- 14.** Parrish CA, Adams ND, Auger KR, Burgess JL, Carson JD, Chaudhari AM, et al. Novel ATP-competitive kinesin spindle protein inhibitors. *J Med Chem* 2007;50(20):4939-4952.
- 15.** Luo L, Parrish CA, Nevins N, McNulty DE, Chaudhari AM, Carson JD, et al. ATP-competitive inhibitors of the mitotic kinesin KSP that function via an allosteric mechanism. *Nat Chem Biol* 2007;3(11):722-726.
- 16.** Rickert KW, Schaber M, Torrent M, Neilson LA, Tasber ES, Garbaccio R, et al. Discovery and biochemical characterization of selective ATP competitive inhibitors of the human mitotic kinesin KSP. *Arch Biochem Biophys* 2008;469(2):220-231.
- 17.** Liu F, You Q, D, Chen Y D. Pharmacophore identification of KSP inhibitors *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2007;17:722-726.
- 18.** Tao W, South VJ, Diehl RE, Davide JP, Sepp-Lorenzino L, Fraley ME, et al. An inhibitor of the kinesin spindle protein activates the intrinsic apoptotic pathway independently of p53 and de novo protein synthesis. *Mol Cell Biol* 2007;27(2):689-698.
- 19.** Vijapurkar U, Wang W, Herbst R. Potentiation of kinesin spindle protein inhibitor-induced cell death by modulation of mitochondrial and death receptor apoptotic pathways. *Cancer Res* 2007;67(1):237-245.
- 20.** Sudakin V, Yen T J. Targeting Mitosis for Anti-Cancer Therapy. *Biodrugs* 2007; 21 (4) 225-233
- 21.** Mao, Desai, Cleveland Microtubule capture by CENP-E silences BubR1-dependent mitotic checkpoint *The Journal of Cell Biology*, Vol. 170, No. 6, September 12 2005 873-880
- 22.** Wood KW, Lad L, Luo L, Qian X, Knight SD, Nevins N, et al. Antitumor activity of an allosteric inhibitor of centromere-associated protein-E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(13):5839-5844.
- 23.** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cooper&part=A2470>

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Kovács Mihálynak szakmai segítségéért valamint Szúnyog Attilának az angol nyelvi lektorálásért.