



ROZPRAWA DOKTORSKA

„Badanie aktywności przeciwnowotworowej i molekularnych mechanizmów działania hybrydowych pochodnych naftalenodionów i kumaryny”

mgr Angelika Długosz-Pokorska

Praca wykonana
w Zakładzie Chemii Biomolekularnej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Promotor
Prof. dr hab. Anna Janecka

Łódź 2019

Streszczenie

Ważnym celem w walce z nowotworami jest poszukiwanie nowych leków o lepszym niż obecnie stosowane profilu działania. Źródłem inspiracji dla chemików są często produkty naturalne, które są traktowane jako związki wyjściowe do modyfikacji chemicznych prowadzących do bardziej aktywnych analogów.

W niniejszej pracy doktorskiej zajęłam się badaniem przeciwnowotworowych właściwości związków hybrydowych, opartych na fragmentach związków naturalnych, zaprojektowanych i zsyntezowanych w Instytucie Chemii Organicznej Politechniki Łódzkiej, w których połączono:

- ✓ motyw naftalenodionu z grupą dietoksyfosforylową (2-chlorofenilo-3-dietoksyfosforylonaftylo[2,3-b]furano-4,9-dion **8a** oraz 3-dietoksyfosforylo-2-hydroksy-1-propylobenzo[f]indolo-4,9-dion **12a**)
- ✓ motyw 3,4-dihydrokumaryny z α , β -nienasyconym układem karbonylowym ((*R*^{*})-8-metoksy-3-metylideno-4-[(*S*^{*})-2-oksocyklo-heksylo]chroman-2-on, AD-013)

Łączenie w jednej cząsteczce fragmentów dwóch grup farmakoforowych jest znanym podejściem, które może prowadzić do nasilenia pożądanych właściwości biologicznych.

Aktywność przeciwnowotworową dwóch analogów łączących motyw naftalenodionu z grupą dietoksyfosforylową badałam na linii raka wątroby HepG2. Analogi te różniły się obecnością w ich strukturze pierścienia furanu lub piranu. Oba analogi powodowały w komórkach HepG2 powstawanie reaktywnych form tlenu, co prowadziło do stresu oksydacyjnego zaburzającego wewnątrzkomórkową równowagę redoks. Natomiast analog zawierający pierścień furanu dodatkowo generował uszkodzenia DNA oraz znacznie silniej niż analog z pierścieniem piranu indukował apoptozę drogą mitochondrialną.

Motyw 3,4-dihydrokumaryny zawierający α , β -nienasycony układ karbonylowy obecny był w związku AD-013. Analog ten wywierał silne działanie cytotoksyczne na komórki raka piersi MCF-7 i białaczki promielocytowej HL-60. AD-013 hamował proliferację, indukował apoptozę oraz uszkodzenia DNA w badanych liniach komórkach, ale znacznie silniej w komórkach MCF-7 (w 80% populacji komórek). Dlatego w kolejnych etapach pracy chciałam ustalić na jakiej drodze dochodziło do tych uszkodzeń i jak komórki nowotworowe reagowały na uszkodzenia DNA.

Szlak odpowiedzi na uszkodzenia DNA (*ang.* DNA damage response, DDR) to złożona grupa białek odpowiedzialnych za wykrywanie uszkodzeń DNA oraz uruchamianie

szlaków sygnałowych determinujących dalsze losy komórki. Centralną funkcję w aktywacji szlaku DDR odgrywają należące do rodziny PIKK (*ang.* phosphatidylinositol 3-kinase related kinase) kinazy ATR (*ang.* ataxia telangiectasia and Rad 3-related protein), ATM (*ang.* ataxia telangiectasia mutated protein) oraz DNA-PK (*ang.* DNA-dependent protein kinase). Aktywacja tych kinaz prowadzi do fosforylacji mediatorów szlaku DDR, które z kolei pobudzają białka wykonawcze (efektorowe). Efektory (takie jak p53) prowadzą do zatrzymania cyklu komórkowego, aktywują mechanizmy naprawcze DNA lub indukują apoptozę, gdy naprawa nie jest możliwa.

W pracy wykazałam, że w komórkach MCF-7 analog AD-013 powodował uszkodzenia DNA prowadząc do aktywacji kinaz rodziny PIKK, ATM i ATR oraz transaktywacji białka p53, kierując wystawione na działanie czynnika stresowego komórki nowotworowe na drogę apoptozy. Analog AD-013 zmniejszał ekspresję DNA-PK oraz hamował aktywność BRCA1, blokując naprawę uszkodzonego DNA.

Następnie badałam wpływ AD-013 na poziom ekspresji transporterów błonowych ABC (ABCB1 i ABCG2), które w wielu rodzajach nowotworów są odpowiedzialne za oporność wielolekową (*ang.* multidrug resistance, MDR). Komórki nowotworowe są w stanie rozwinąć fenotyp MDR w oparciu o kombinację kilku mechanizmów, do których zaliczamy: zmiany metaboliczne, inaktywację stosowanego leku, hamowanie procesu apoptozy, aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B oraz najczęściej spotykane, zmiany w procesach naprawczych DNA, czy też nadekspresję białek błonowych rodziny ABC.

Transportery ABC są to wielodomenowe białka błonowe, wykorzystujące energię z hydrolizy ATP do przenoszenia substancji przez błonę komórkową. Wykazano, że wiele z tych transporterów odpowiedzialnych jest za oporność wielolekową, ponieważ szybko dzielące się komórki nowotworowe wykorzystują je jako obronę przed farmakologiczną interwencją. Najczęściej wykorzystywaną strategią terapeutyczną, która pozwala przełamać oporność komórek nowotworowych jest jednoczesne podawanie cytostatyków oraz inhibitorów transporterów ABC.

Wykazałam, że w komórkach MCF-7 analog AD-013 hamował aktywność czynnika NF- κ B oraz hamował aktywność transporterów błonowych ABCB1 i ABCG2. Ponadto, analog ten stosowany w połączeniu ze znanymi lekami przeciwnowotworowymi, taksolem lub oksaliplatyną, wykazywał silne działanie synergistyczne.

Summary

The search for novel anticancer drug candidates is still a priority goal for cancer therapy. Natural products serve as the source of inspiration for chemical modifications, leading to more active analogs.

In my dissertation I investigated the anticancer properties of new hybrid compounds designed on the basis of natural compounds, which were designed and synthesized in the Institute of Organic Chemistry, Lodz University of Technology, that combine:

- 1,4-naphthalenedione motif with phosphonic acid moiety (2-chlorophenyl-3-diethoxyphosphorylnaphthyl [2,3-b] furan-4,9-dione **8a** and 3-diethoxyphosphoryl-2-hydroxy-1-propylbenzo-[f]-indole-4,9-dione **12a**)
- A coumarin scaffold with an α -methylidene- δ -lactone motifa ((R *)-8-methoxy-3-methylidene-4 - [(S *) - 2-oxocyclohexyl]chroman-2-one, AD-013).

Combining two pharmacophoric motifs displaying desirable cytotoxic effects may enhance biological activity and/or improve therapeutic properties of such molecular hybrids.

In my study I evaluated the anticancer activity of two analogs combining 1,4-naphthalenedione motif with phosphonic acid moiety (**8a** and **12a**) in HepG2 cancer cells. The structure of these analogs differed by the presence of furan or pyran ring. Both compounds produced the reactive oxygen species in HepG2 cancer cells, leading to disruption of intracellular redox homeostasis. Additionally, analog with a furan ring strongly activated the intrinsic pathway of apoptosis and generated DNA damage in HepG2 cells, while analog with a pyran ring did not cause genotoxicity.

The 3,4-dihydrocoumarin motif containing an α -methylidene- δ -lactone fragment was present in the compound designated AD-013. This analog showed a strong cytotoxic effect in two cancer cell lines, MCF-7 and HL-60. AD-013 inhibited proliferation, induced apoptosis and DNA damage in both cell lines but the effect was much stronger in MCF-7 cells (DNA damage in about 80% of cell population). Therefore, in the next stages of my work I wanted to investigate the DNA damage-response (DDR) pathway in MCF-7 cells treated with AD-013.

The DDR pathway consists of proteins that detect DNA damage in the cells and decide on the faith of these cells. The most important role in the activation of DDR pathway plays the family of phosphoinositide-3-kinases (PI3Ks), such as ataxia-teleangiectasia-mutated (ATM) proteins, ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR) proteins and DNA-dependent

protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs). The activation of these kinases is linked to phosphorylation transducers and mediator proteins facilitating phosphorylation of effectors. Effectors (such as p53) can evoke either cell-cycle arrest, activation of DNA repair mechanisms or apoptosis, when repair is not possible.

Analog AD-013 induced in MCF-7 cells DNA damage, followed by the activation of ATM, ATR and p53 and down-regulation of DNA repair-associated genes *BRCA1* and *DNA-PK*, resulting in the DNA repair defects and apoptosis. Then, I performed the evaluation of the possible effects of AD-013 on the gene and protein expression of ABCB1 and ABCG2 transporters, related to chemoresistance in cancer therapy.

Cancer cells are able to develop many different mechanisms of MDR phenotype, such as metabolic changes, drug degradation, cell death inhibition, activation of NF- κ B and very often, changes in DNA repair processes and overexpression of ATP-binding cassette.

ABC transporters is a family of transmembrane proteins that use the energy from ATP hydrolysis to efflux various chemically diverse or potentially dangerous compounds across a cell membrane. While efflux via ABC transporters is a normal physiological process, it is also a known mechanism of drug resistance in cancer cells. For this reason, the commonly used strategy to overcome the MDR phenotype has been focused on identifying inhibitors of ABC transporters which are related to chemoresistance. Such inhibitors, used in combination with known anticancer drugs could improve drugs' efficacy and suppress resistance.

In my dissertation I proved that AD-013 inhibited NF- κ B transcriptional activity, decreased expression level of ABC transmembrane transporters (ABCB1 and ABCG2) and acted as an MDR inhibitor in the cells with over-expression of ABC transporters. Furthermore, AD-013 used in combination with taxol or oxaliplatin showed a strong synergistic effect.