



Universidade Estadual Paulista

„Júlio de Mesquita Filho“

&

Technische Universität Dresden



**RES** ROLAND ERNST STIFTUNG  
für Gesundheitswesen

**Simulationsstudie und Synthese von Topoisomerase 2 $\alpha$   
hemmenden Pd/Pt-Komplexen mit potentieller  
toxischer Aktivität gegen Krebszellen**

*Berthold Ludwig Reis*

**Brasilianische Betreuer:**

*Prof. Dr. Nailton Nascimento Junior*

*Victor Batista*

*Msc. Renan Lira*

**Araraquara, 2018**

# **Teil 1 – Simulationsstudie und Synthese von Etoposid-basierten Molekülen zur Hemmung von Topoisomerase 2 $\alpha$**

Keywords: Etoposid, Topoisomerase 2 $\alpha$ , Pd-Komplex, Pt-Komplexe, kleine Moleküle, docking-Simulationen, Protein-Ligand Interaktion.

## **Abstract:**

Dieses Projekt zielt auf die Hemmung der in Brustkrebs, Eierstockkrebs und Prostatakrebs überexpressionierte Topoisomerase 2 $\alpha$ . Unter Verwendung der kristallografischen Struktur wurden docking-Simulationen durchgeführt.

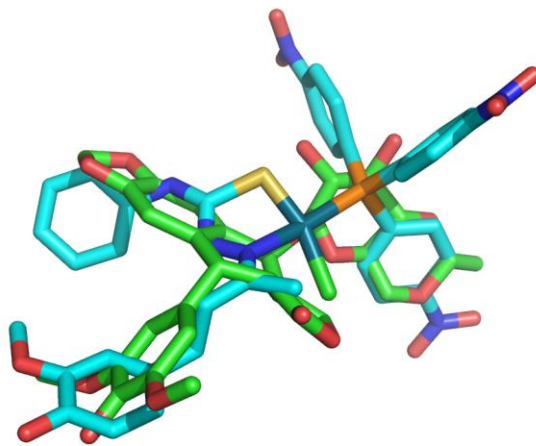
## **Einleitung:**

Jeder Mensch kommt an irgendeinem Punkt in seinem Leben in Kontakt mit dem Thema Krebs. Es kann jemanden den man kaum kennt, einen Freund, ein Familienmitglied oder einen selbst treffen. Eines der größten Probleme für die Therapie ist die hohe Varianz der Krebsarten und die Notwendigkeit für spezifische Behandlung.<sup>1</sup> Dieses Projekt stellt drei der tödlichsten Krebsarten, Brustkrebs, Eierstockkrebs und Prostatakrebs, in den Fokus. Brustkrebs befällt um die 12 % aller Frauen und ist damit die häufigste Krebsart weltweit.<sup>2</sup> Die American Cancer Society schätzt, dass 2018 allein in den USA 266120 neue Fälle von Brustkrebs auftreten werden. Dies stellt 30 % aller neuen Krebsfälle dar.<sup>3</sup> Eierstockkrebs ist die viert häufigste Todesursache für Frauen bei den krebsbezogenen Toden.<sup>1</sup> Es wird geschätzt, dass im Jahr 2018 4 % aller Tode durch Krebs darauf zurückzuführen sein werden. Prostatakrebs ist die zweithäufigste Krebsart bei Männern.<sup>1</sup> Ungefähr 9 % aller krebsbezogenen Tode von Männern werden 2018 durch Protatakrebs verursacht werden.<sup>3</sup>

Einige der aggressivsten Unterarten von Brustkrebs, Eierstockkrebs und Prostatakrebs stehen in Zusammenhang mit einer Überfunktion (Überexpression) des Topoisomerase-enzym. Diese Überfunktion führt zu einer schnellen und unkontrollierten Zellproliferation.<sup>4-6</sup> Ein möglicher therapeutischer Ansatz ist die Hemmung der Topoisomerasen. Mittel Schneiden, Entknäuelung und erneuten Zusammenfügen der DNA reduzieren diese Enzyme die Spannung welche die Strangöffnung beim Transcriptionsprozess hervorruft. Wenn man sie hemmt erliegt der gesamte Replikationsprozess worauf die Zelle Apoptosis (Zelltod) einleitet.

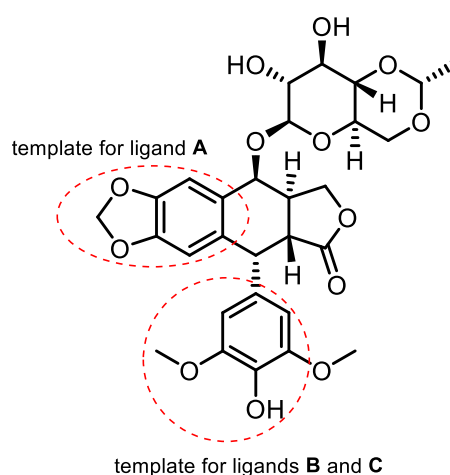
Ein bekanntes Medikament in der Chemotherapie ist Etoposid. Es hemmt die Topoisomerase 2 $\alpha$  indem es einen stabilen ternären Komplex mit DNA und Enzym ausbildet. Diese Stabilisierung hindert die DNA am rekombinieren und führt somit zu irreversiblen Strangbrüchen.<sup>7</sup> Da Etoposid auf alle Körperzellen wirkt ist seine Selektivität relativ gering. Aufgrund der erhöhten Topoisomerase 2 $\alpha$  Aktivität der schnell wachsenden Zellen, leiden diese signifikant stärker unter dieser Therapie. Neben der Adressierung der sich schnell reproduzierenden Krebszellen führt dies zu einer Reihe von ungewünschten Nebenwirkungen. Andere, nicht krankheitsbezogene, aber dennoch schnellwachsende Zellen, wie Haarwurzeln und Knochenmark, werden ebenfalls stark angegriffen. Der Stress, welcher auf das gesamte System ausgeübt wird, führt zu Übelkeit, Erbrechen, Diarhoe, Schwellungen und Schmerz in den Extremitäten, Gelbfärbung der Haut und in einigen Fällen Blutkrebs.<sup>8</sup> Aufgrund dieser Nachteile wird Etoposid hauptsächlich als zweite Behandlungslinie für metastatischen Brustkrebs eingesetzt. Die gesamt Anspruchsrate in den letzten 20 Jahren war 18,5 % und die Rate des klinischen Nutzen (clinical benefit rate) betrug 45,8 %.<sup>8</sup> In Anbetracht der vielen Nebenwirkungen wird Etoposid als mittelmäßig effektiv eingeschätzt. Um bessere Therapiemöglichkeiten zu finden müssen sowohl die Selektivität als auch die Aktivität verbessert werden.

Ein eloquenter Ansatz für dieses Ziel ist die Verwendung von hoch variablen Metallkomplexen. An ein metallisches Zentrum koordiniert kann eine Vielzahl von verschiedensten Liganden die unterschiedlichsten Eigenschaften entfalten. Das Ziel ist es ein Topoisomerase hemmendes Kompositum zu schaffen, indem man die Struktur von Etoposid imitiert. Als Koordinationszentren dienen dabei Palladium (Pd) und Platin (Pt). Der Vorteil der Verwendung dieser Metalle liegt darin, dass sie quadratisch-planare Komplexe bilden welche die Geometrie von Etoposid mimen falls sie richtig substituiert sind. Die **Abbildung 1** zeigt eine Beispielstruktur überlagert mit der Etoposidstruktur vom Kristall. In Hinblick auf das Ausmaß und die Anordnung der Komponenten ist zu erkennen, dass die Komponenten eine hohe Ähnlichkeit aufweisen. Lediglich die Funktionalitäten variieren



**Abbildung 1** – Überlagertes Beispiel eines Metallkomplexes (blau) mit Etoposid (grün)

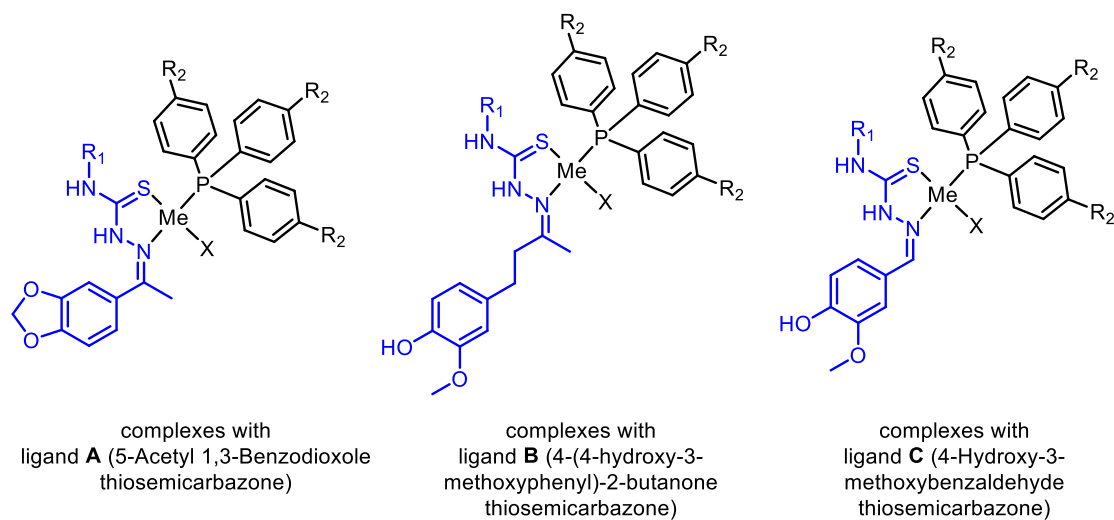
Weiterhin sind die Bioaktivität und Biokompatibilität von Pt und Pd bekannt, da sie bereits in mehreren modernen Medikamenten Einsatz finden.<sup>9,10</sup> Die Liganden sind die Schlüsselkomponenten um die Affinität zur Bindungsstelle des Komplexes an das Enzym zu modellieren. Etoposid besitzt zwei Substrukturen von welchen bekannt ist, dass sie für den Großteil der wichtigen Enzym-Etoposid Wechselwirkungen verantwortlich sind.<sup>11</sup> Zwei der vier möglichen Koordinationsstellen des Metallkomplexes sind daher Liganden vorbehalten, welche diesen Substrukturen ähneln (**Abbildung 2**).



**Abbildung 2** – Struktur von Etoposid mit aktiven Substrukturen (rot eingekreist), welche als Template für die Liganden **A**, **B** und **C** dienen.

Um die Ligandenkombination mit der höchsten Aktivität zu ermitteln wurden Computersimulationen (docking simulations) durchgeführt. Über die Berechnung der Wechselwirkungen und Anbindungspositionen der Wirkstoffmoleküle zur Etoposid Bindungsstelle können aus der Vielzahl der möglichen Strukturen einige wenige ermittelt werden, für welche sich die Synthese lohnt. Als Beurteilungsgrundlage wird dabei angenommen, dass die Substanzen, welche ähnliche Wechselwirkungen wie Etoposid aufweisen die höhere Aktivität besitzen.

Der erste Schritt Richtung docking-Simulationen ist das virtuelle Konstruieren der Liganden (**Abbildung 3**). Durch die Variation des Metallzentrums, die unterschiedlich substituierten Etoposid-basierten Liganden **A**, **B** oder **C**, verschiedenste triphenylphosphine Liganden und unterschiedliche Halogenide/ Thiocyanate ergeben sich insgesamt 600 mögliche Komplexe. Weiterhin wurden zusätzliche 48 Dimere untersucht.



**Abbildung 3** – Virtuell designte **R1**: H, Me, Et, Ph; **R2**: H, Me, F, OMe, NO<sub>2</sub>; **Me**: Pd, Pt; **X**: Cl, Br, I, SCN, NCS

Die Geometrie dieser 648 Komponenten muss optimiert werden, wofür ein semiempirisches Kraftfeld MOPAC PM7 verwendet wird. Dabei werden die Geometrien mit den geringsten Energien berechnet.

Parallel wird die beste Scorefunction per Redockingverfahren ermittelt. Dabei wird der Originalligand an die Originalkristallstruktur mit verschiedenen Funktionen angedockt. Über Vergleich der Ergebnisse mit den Originalwechselwirkungen kann ermittelt werden,

welche Funktion das System am besten beschreibt. Danach wird die beste Funktion genutzt um die optimierten Moleküle anzudocken. Die Ergebnisse der Berechnung werden analysiert und die besten Komplexe synthetisiert.

## **Experimentalteil:**

Computersimulation:

Die Kristallstruktur der Topoisomerase 2 $\alpha$  cokrystallisiert mit Etoposid, wurde von der Protein Data Base free website heruntergeladen (PDB-ID: 5GWK, 3,15 Å resolution). Das Redocking wurde mit der Software GOLD 5.6 (CCDC GOLD Suite 2018 (v.5.6) [Jones, G.; Willet, P.; Glen, R.; Leach, A.; Taylor, R. Journal of Molecular Biology, **1997**, 267 (1997), 727-748] durchgeführt. Dabei wurden 4 Berechnungsfunktionen (scorefunction) verglichen: ASP, ChemScore, ChemPLP und GOLDScore.

Parallel wurden die 3D Strukturen der Komplexe virtuell mit dem Discovery Studio Visualizer, Discovery Studio Visualizer free software (DSV/Version: 17.2.0) [Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017, San Diego: Dassault Systèmes, 2016] entworfen. Die Geometrie der Pt-Komplexe wurde mithilfe des semiempirischen Kraftfeld MOPAC PM7 optimiert [MOPAC2016, James J. P. Stewart, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, [HTTP://OpenMOPAC.net](http://OpenMOPAC.net)]. Die Keywords dabei waren: MMOK, XYZ, SLOG, CHARGE=+1 (Dimeres CHARGE=0). Die Pd-Komplexe wurden mit free software Gabedit 2.5.0 [A.R. ALLOUCHE, Gabedit - A graphical user interface for computational chemistry softwares, Journal of Computational Chemistry, 32 (2011) 174-182. DOI: 10.1002/jcc.21600], da diese Software die Applikation eines Restraints erlaubte, welcher zur Wahrung der planaren Struktur nötig war.

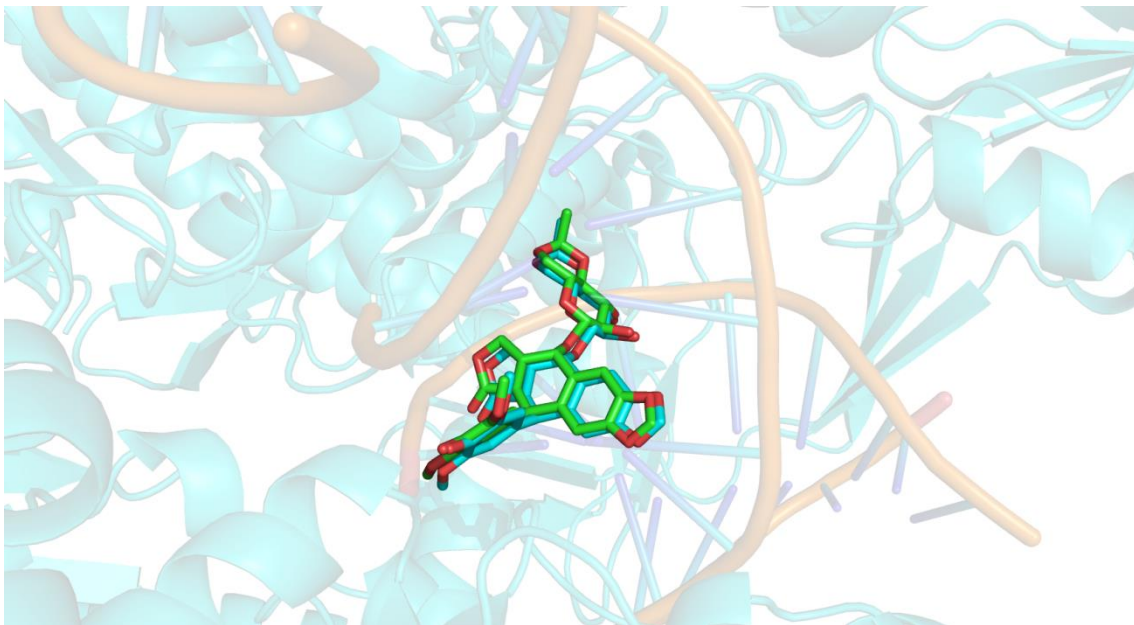
Die optimierten Strukturen wurden dann anschließend mit GOLD an die Topoisomerase andockt. Die Ergebnisse wurden mit Discovery Studio ausgewertet. Bilder wurden mit Pymol (v0.99) [The PyMOL Molecular Graphics System, Version 0.99 Schrödinger, LLC] generiert.

## Ergebnisse und Diskussion

### Redocking von Etoposid

Die vier Scorefunctions ASP, ChemScore, ChemPLP und GOLDScore wurden auf ihr Vermögen getestet die Originalposition und Interaktionen zu reproduzieren.<sup>12</sup> Der Vergleichsparameter war die Wurzel aus dem Mittel der quadratischen Abweichung. Weiterhin wurde darauf geachtet, ob die jeweilige Funktion die Lösung mit der geringsten Abweichung möglichst hoch eingestuft (funktionsbasierte Wertung, ranking) hat.

Eine der Funktion übertraf die anderen in ihrer Leistung. Sie war sehr gut in der Lage die Original-Etoposidposition zu reproduzieren. **Abbildung 4** zeigt die Originale mit der berechneten Position. Die Überlagerung ist sehr hoch.



**Abbildung 4** – Überlagerte Position des berechneten Etoposid (blau) mit dem original-Etoposid (grün).

### Docking-Simulationen der Pd/Pt Komplexe

Von den 648 Komplexen wurden die 40 Spitzenreiter (nach funktionsbasierter Wertung) exportiert und analysiert. Dabei wurden die, welche die gleichen Wechselwirkungen wie Etoposid aufwiesen, als die besten gewertet. Je mehr Schlüsselaminosäuren von dem Komplex adressiert wurden, desto höher wurde seine Affinität eingestuft. Weiterhin wurde ein proportionaler Zusammenhang zwischen Affinität und Aktivität angenommen. Der beste Komplex war in der Lage 17 von 18 Schlüsselwechselwirkungen zu reproduzieren.

Von den 40 Komplexen wurden die 10 mit den besten Wechselwirkungen ermittelt. Diese konnten teilweise synthetisiert werden. Die Arbeit wird momentan vom Betreuer Renan Lira weitergeführt. Die hergestellten Komplexe werden anschließend in Zellversuchen auf ihre Aktivität hin untersucht.

## **Literaturverzeichnis:**

1. BW, S. & CP, W. *World Cancer Report 2014*.
2. McGuire, A., Brown, J. A. L., Malone, C., McLaughlin, R. & Kerin, M. J. Effects of Age on the Detection and Management of Breast Cancer. *Cancers (Basel)* **7**, 908–929 (2015).
3. Cancer Facts & Figures 2018 | American Cancer Society. Available at: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2018.html>. (Accessed: 22nd June 2018)
4. Depowski, P. L. *et al.* Topoisomerase IIalpha expression in breast cancer: correlation with outcome variables. *Mod. Pathol.* **13**, 542–547 (2000).
5. Schaefer-Klein, J. L., Murphy, S. J., Johnson, S. H., Vasmatazis, G. & Kovtun, I. V. Topoisomerase 2 Alpha Cooperates with Androgen Receptor to Contribute to Prostate Cancer Progression. *PLoS ONE* **10**, e0142327 (2015).
6. Branca, M. *et al.* Over-expression of topoisomerase IIalpha is related to the grade of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and high-risk human papillomavirus (HPV),



but does not predict prognosis in cervical cancer or HPV clearance after cone treatment. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **25**, 383–392 (2006).

7. Burden, D. A. *et al.* Topoisomerase II. etoposide interactions direct the formation of drug-induced enzyme-DNA cleavage complexes. *J. Biol. Chem.* **271**, 29238–29244 (1996).
8. Voutsadakis, I. A. A Systematic Review and Pooled Analysis of Studies of Oral Etoposide in Metastatic Breast Cancer. *Eur J Breast Health* **14**, 10–16 (2018).
9. Frezza, M. *et al.* In vitro and in vivo antitumor activities and DNA binding mode of five coordinated cyclometalated organoplatinum(II) complexes containing biphosphine ligands. *J. Med. Chem.* **54**, 6166–6176 (2011).
10. Ray, S. *et al.* Anticancer and antimicrobial metallopharmaceutical agents based on palladium, gold, and silver N-heterocyclic carbene complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 15042–15053 (2007).
11. Bender, R. P. *et al.* Substituents on Etoposide That Interact with Human Topoisomerase II $\alpha$  in the Binary Enzyme–Drug Complex: Contributions to Etoposide Binding and Activity. *Biochemistry* **47**, 4501–4509 (2008).
12. Li, Y., Han, L., Liu, Z. & Wang, R. Comparative Assessment of Scoring Functions on an Updated Benchmark: 2. Evaluation Methods and General Results. *J. Chem. Inf. Model.* **54**, 1717–1736 (2014).

**Danksagung:**

Der Autor dankt der Roland Ernst Stiftung für die Ermöglichung dieses Projekts durch die finanzielle Unterstützung.