

Received: 01.07.2016
Accepted: 16.08.2017
Published: 08.12.2017

SUMO-swoiste proteazy SENP jako potencjalne cele w terapii nowotworów

SUMO proteases as potential targets for cancer therapy

Piotr Bialik, Katarzyna Woźniak

Katedra Genetyki Molekularnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie

Sumoilacja jest jedną z potranslacyjnych modyfikacji białek, która odgrywa ważną rolę w regulacji wielu procesów komórkowych, takich jak replikacja i naprawa DNA, transkrypcja, przekazanie sygnału i transport jądrowy. Podczas sumoilacji, białka SUMO (small ubiquitin-like modifier) są kowalencyjnie przyłączane do grupy ε-aminowej lizyny w białku docelowym poprzez kaskadę reakcji enzymatycznych przebiegających z udziałem enzymów E1, E2 i E3. Ważnym aspektem sumoilacji jest jej odwracalność, w której główną rolę odgrywają SUMO-swoiste proteazy cysteinowe SENP. SENP (sentrin/SUMO-specific proteases) katalizują reakcję odłączania białek SUMO od substratu, dzięki aktywności izopeptydazowej. Enzymy te są zaangażowane także, dzięki aktywności hydrolazowej, w reakcję dojrzewania białek SUMO, która polega na usunięciu krótkiego fragmentu C-końca nieaktywnej postaci SUMO i odsłonięciu dwóch reszt glicyny. Proteazy SUMO odgrywają zatem ważną rolę w utrzymaniu równowagi między sumoilacją i desumoilacją białek, która jest konieczna do prawidłowego funkcjonowania komórki. U ssaków zidentyfikowano sześć izoform proteaz SUMO – SENP1, SENP2, SENP3, SENP5, SENP6 i SENP7. Izofomy te podzielono na trzy grupy ze względu na podobieństwo sekwencji, swoistość substratów i umiejscowienie w komórce. Wyniki badań wskazują na rolę proteaz SUMO w rozwoju chorób człowieka, w tym nowotworów, sugerując tym samym, że białka te mogą być ważnymi celami dla nowych leków.

Słowa kluczowe:

SUMO • SENP • sumoilacja • desumoilacja • nowotwory • cele terapii

Summary

Sumoylation is one of the post-translational modifications of proteins, responsible for the regulation of many cellular processes, such as DNA replication and repair, transcription, signal transduction and nuclear transport. During sumoylation, SUMO proteins are covalently attached to the ε-amino group of lysine in target proteins via an enzymatic cascade that requires the sequential action of E1, E2 and E3 enzymes. An important aspect of sumoylation is its reversibility, which involves SUMO-specific proteases called SENPs. SENPs (sentrin/SUMO-specific proteases) catalyze the deconjugation of SUMO proteins using their isopeptidase activity. These enzymes participate through hydrolase activity in the reaction of SUMO protein maturation, which involves the removal of a short fragment on the C-terminus of SUMO inactive form and exposure two glycine residues. SENPs are important for maintaining the balance between sumoylated and desumoylated proteins required for normal cellular physiology. Six SENP isoforms (SENP1, SENP2, SENP3, SENP5, SENP6 and SENP7) have been identified in mammals. These SENPs can be divided into three subfamilies based on their sequence homology, substrate specificity and subcellular localization. Results of studies indicate the role of SUMO proteases in the development of human diseases including cancer, suggesting that these proteins may be attractive targets for new drugs.

Keywords:

SUMO • SENP • sumoylation • desumoylation • cancer • targets of therapy

GICID:	01.3001.0010.6667
DOI:	10.5604/01.3001.0010.6667
Word count:	4013
Tables:	1
Figures:	2
References:	50

Adres autorki: prof. dr hab. Katarzyna Woźniak, Katedra Genetyki Molekularnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź; e-mail: woźniak@biol.uni.lodz.pl

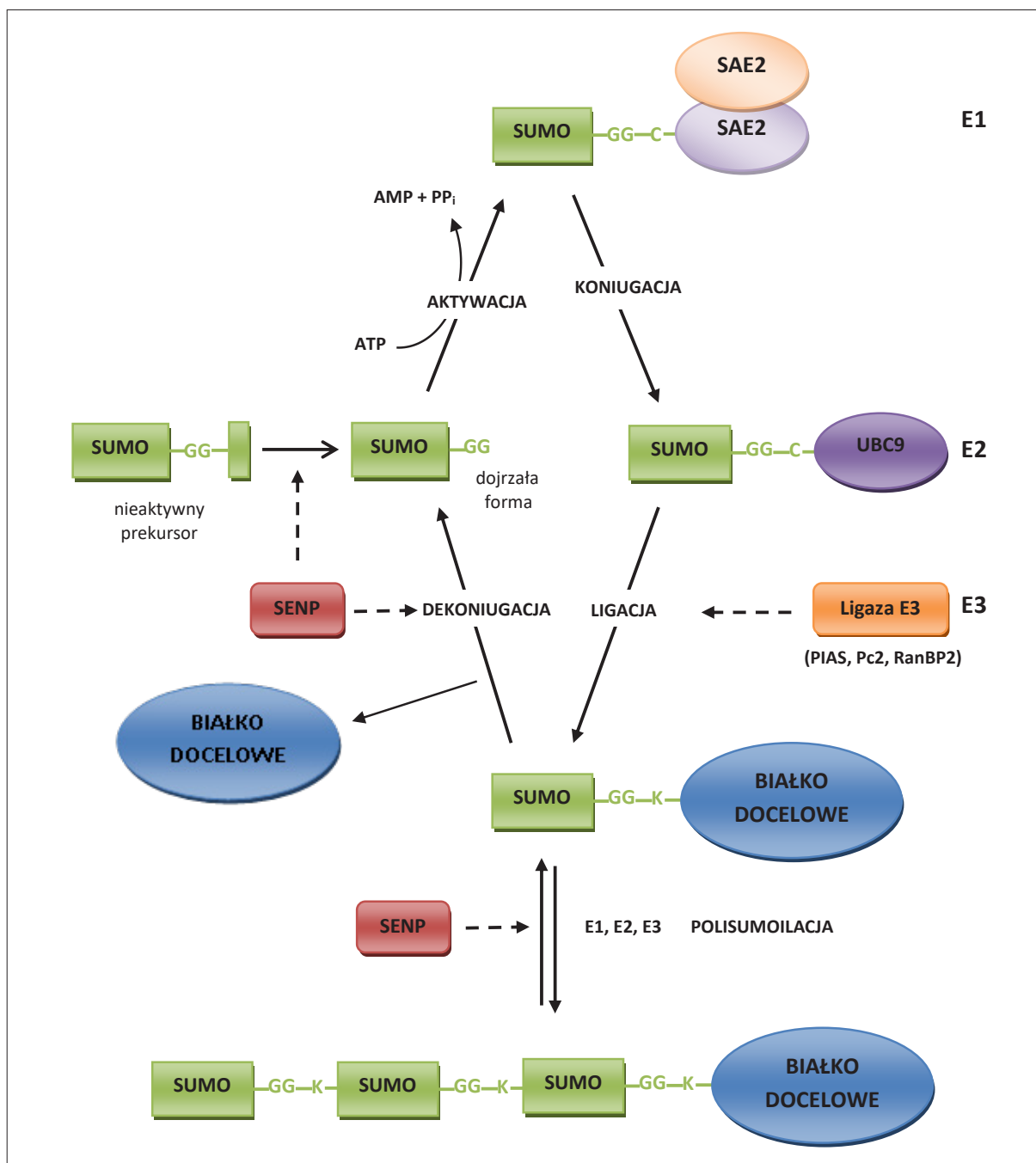
Wykaz skrótów: **AR** – receptor hormonów androgenowych (androgen receptor); **CDKs** – kinazy zależne od cyklin (cyclin-dependent kinases); **c-Jun** – jądrowy czynnik transkrypcyjny wchodzący w skład czynnika AP-1; **EMT** – transformacja nabłonkowo-mezenchymalna (epithelial-mesenchymal transition); **FoxM1** – czynnik transkrypcyjny (transcription factor forkhead box protein M1); **HDAC1** – deacetylaza histonów 1 (histone deacetylase 1); **HDAC3** – deacetylaza histonów 3 (histone deacetylase 3); **HIF-1α** – podjednostka α czynnika transkrypcyjnego indukowanego niedotlenieniem (hypoxia-inducible factor 1-alpha); **HP1α** – białko heterochromatynowe 1α (heterochromatin protein 1-alpha); **IC₅₀** – stężenie inhibitora hamujące w 50% funkcje biologiczne i biochemiczne komórek i organizmów (inhibitory concentration); **MMP9** – metaloproteinaza 9 (matrix metalloproteinase 9); **NES** – sygnał eksportu jądrowego (nuclear export sequence); **NLS** – sygnał lokalizacji jądrowej (nuclear localization sequence); **OSCC** – płaskokomórkowy rak jamy ustnej (oral squamous cell carcinoma); **PIAS** – białkowy inhibitor aktywowanego STAT (protein inhibitor of activated STAT); **ROS** – reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species); **SAE** – heterodimeryczny enzym aktywujący białko SUMO (SUMO-activating enzyme); **SENP** – SUMO-swoista proteaza cysteinowa (sentrin/SUMO-specific protease); **SUMO** – białko SUMO, podobne do ubikwityny (small ubiquitin-like modifier); **STAT** – białka przekazujące sygnał i aktywujące transkrypcję (signal transducer and activator of transcription); **UBC9** – enzym koniugujący w cyklu sumoilacji (ubiquitin-conjugating enzyme 9); **TGF-βRI** – receptor typu I transformującego czynnika wzrostu TGF-β (receptor I of transforming growth factor beta); **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (vascular endothelial growth factor).

BIAŁKA SUMO I SUMOILACJA

Białka SUMO to niewielkie cząsteczki o masie cząsteczkowej około 10 kDa, podobne do ubikwityny. W komórkach ssaków dochodzi do ekspresji czterech izoform białka SUMO: SUMO-1, -2, -3 oraz -4. Białka te u człowieka wykazują wysoki stopień podobieństwa sekwencji: SUMO-1 jest identyczne sekwencyjnie w 48% z SUMO-2 i w 46% z SUMO-3. Białka SUMO-2 i -3 wykazują około 97% homologii, a białko SUMO-4 jest w 87% identyczne sekwencyjnie z SUMO-2. Białka SUMO-2 i -3 (zwane także SUMO-2/3 ze względu na wysoki stopień homologii), w przeciwieństwie do SUMO-1, są zdolne do tworzenia izopeptydowych wiązań między C-końcówką resztą glicyny jednego białka SUMO a lizyną w 11 pozycji innej cząsteczki SUMO-2/3, tworząc w ten sposób łańcuchy polimerowe [28]. Udział białka SUMO-4 w procesie sumoilacji jest sporny ze względu na obecność Pro w miejscu Gln90 w innych izoformach SUMO. Prolina powoduje ograniczenie konformacyjne w prekursorze SUMO-4, które uniemożliwia działanie proteazy SUMO, nie dochodzi więc do powstania dojrzałej postaci SUMO-4 [6,8,34].

Białka SUMO ulegają ekspresji w postaci prekursorów, które w wyniku działania proteaz SENP tracą C-końce, co powoduje odsłonięcie dwóch reszt glicyny, umożli-

wiając tym samym powstawanie wiązania kowalencyjnego z grupą ε-aminową lizyny białka docelowego [15]. Zanim jednak dojdzie do powstania tego wiązania, następuje wiele reakcji enzymatycznych z udziałem enzymu aktywującego E1, koniugującego E2 i ligazy E3 (ryc. 1). W pierwszym etapie enzymatycznej kaskady dojrzałe białko SUMO ulega związaniu przez heterodimeryczny enzym E1 – SAE (SUMO-activating enzyme), składający się z podjednostek SAE1 i SAE2. Z udziałem ATP powstaje kompleks SUMO-E1, w którym cysteina w pozycji 173 (Cys173) podjednostki SAE2 wiąże się wiązaniem tioestrowym z glicyną w pozycji 97 (Gly97) w C-końcu białka SUMO. Następnym etapem jest przeniesienie białka SUMO na enzym koniugujący E2, tj. białko UBC9 (SUMO-E2-conjugating enzyme). Powstaje kompleks SUMO-UBC9 dzięki wiązaniu tioestrowemu między Gly97 w białku SUMO i Cys93 w zachowanym ewolucyjnie motywie w N-końcu białka UBC9. Enzym ten katalizuje utworzenie wiązania izopeptydowego między grupą karboksylową glicyny w C-końcu białka SUMO i grupą ε-aminową lizyny w białku docelowym [15]. W warunkach *in vitro* sumoilacja może się opierać wyłącznie na enzymach E1 i E2; *in vivo* często niezbędny jest udział czynnika E3, pełniącego funkcję ligazy. W roli E3 najczęściej występują białka PIAS (protein inhibitor of activated STAT), białko RanBP2 (Nup358) i białko Pc-2 należące do rodziny białek Polycomb.



Ryc. 1. Schemat przebiegu procesu sumoilacji (wg [45] zmodyfikowano)

Klasyczną sekwencją, w obrębie której dochodzi do sumoilacji jest sekwencja: Ψ LysXGlu/Asp (Ψ KXE/D), gdzie Ψ oznacza aminokwas hydrofobowy, taki jak Ile, Leu czy Val; w miejscu X może występować dowolny aminokwas [15].

PROTEAZY SUMO

Swoiste proteazy SUMO, istotne na etapie aktywacji prekursora białka SUMO, biorą również udział w desumoilacji, umożliwiając szybkie odwrócenie modyfikacji substratu i odłączenie cząsteczki SUMO. Enzymy te

różnią się między sobą strukturą, powinowactwem do konkretnych izoform białka SUMO i umiejscowieniem w komórce [49]. Obecnie znanych jest sześć izoform proteaz SUMO: SENP1, SENP2, SENP3, SENP5, SENP6 i SENP7 (tabela 1). Ze względu na swoistość substratową, homologię sekwencji oraz subkomórkową lokalizację proteazy te można podzielić na trzy podrodziny. SENP1 oraz SENP2 tworzą podrodzinę pierwszą i charakteryzują się dużą swoistością dla białek SUMO-1 i SUMO-2/3. Podrodzina druga to SENP3 i SENP5, które wykazują działanie wybiórcze w kierunku cząsteczek SUMO-2/3. W skład

ostatniej podrodziny wchodzą SENP6 i SENP7. Proteazy te wykazują umiarkowane zaangażowanie w proces dekonjugacji monomerycznego SUMO-2/3, znacznie wpływając na procesy koniugacji i dekonjugacji polimerycznego SUMO-2/3. Ponadto, SENP6 i SENP7 mają jeszcze unikalną właściwość demontażu polimerycznych cząsteczek SUMO-2/3 (chain editing) [7,49].

Nie wszystkie proteazy SENP są swoiste wobec białek SUMO. Znana jest proteaza SENP8 (opisywana także jako białko NEDP1 lub DENP1), która wykazuje swoistość wobec innego, podobnego do ubikwityny białka NEDD8 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8) [14,22]. SENP8 bierze udział w modyfikacji białek zwanej neddyacją, zarówno na etapie dojrzewania prekursora NEDD8, jak i jego odłączania od białkowego substratu.

Proteazy cysteinowe SENP zwane również tiolowymi lub sulfhydrylowymi charakteryzują się obecnością konserwatywnej domeny katalitycznej znajdującej się w C-końcu, której obszar jest jednym z najczęściej badanych fragmentów tych białek. W jego skład wchodzi około 250 reszt aminokwasowych determinujących swoistość oraz funkcjonalność proteaz SENP. Miejsce katalityczne jest zbudowane z typowej triady katalitycznej składającej się z cysteiny, histydyny i asparaginy. Funkcja triady katalitycznej jest niezwykle istotna w obróbce prekursorów białek SUMO, ale także w procesie dekonjugacji. Subkomórkowe położenie proteaz SENP zależy od obecności mniej lub bardziej konserwatywnego regionu

N-końcowego zawierającego sygnał lokalizacji jądrowej NLS oraz obecnego na C-końcu sygnału eksportu jądrowego NES [14]. Proteaza SENP1 występuje głównie w nukleoplazmie. SENP2 jest ściśle związana z SENP1 i występuje głównie w jądrowym kompleksie porowym otoczki jądrowej i w nukleoplazmie. SENP3 oraz SENP5 są umiejscowione w jąderku, natomiast SENP7 w nukleoplazmie. W przypadku umiejscowienia białka SENP6 pierwsze doniesienia wskazywały, iż jego miejscem występowania jest cytoplazma, jednak na podstawie ostatnich badań udowodniono, że białko to znajduje się podobnie jak wszystkie inne proteazy SUMO w jądrze komórkowym [32].

PROTEAZY SUMO W CHOROBAH NOWOTWOROWYCH

Wiele danych wskazuje na istotny związek między sumoilacją a szlakami biochemicznymi uczestniczącymi w powstawaniu i rozwoju nowotworów oraz innych chorób człowieka [7,22,44,45,48,50]. Zaburzenia w cyklicznych procesach sumo- i desumoilacji mogą zakłócać homeostazę komórkową, zmieniać skuteczność naprawy DNA oraz sprzyjać indukcji i promocji nowotworów złośliwych.

W wielu typach nowotworów obserwuje się nadekspresję enzymów biorących udział w cyklu SUMO, w tym proteaz SENP. Najlepiej pod tym względem zbadano proteazy SENP1 i SENP2. Nadekspresję SENP1 wykazano w gruczolakoraku tarczycy [19], raku stercza [3,12,42], gruczolakoraku trzustki [27] i raku płuca [31]. Podobnie w raku jelita grubego obserwuje się wzrost ekspresji genu jak i białka

Tabela 1. Właściwości biologiczne i strukturalne SUMO-swoistych proteaz SENP człowieka [25,49]

SENP	Inne nazwy	Główna lokalizacja w komórce	Specyficzność	Aktywność enzymatyczna	Liczba aminokwasów/ położenie domeny katalitycznej
SENP1	SuPr-2	Nukleoplazma	SUMO-1/2/3	C-końcowa hydrolaza, izopeptydaza	643/419-643
SENP2	SuPr-1, AXAM2, SMT3IP2	Kompleks porów jądrowych	SUMO-1/2/3	C-końcowa hydrolaza, izopeptydaza	589/365-589
SENP3	SSP3, SMT3IP1	Jąderko	SUMO-2/3	Izopeptydaza	574/353-574
SENP5		Jąderko	SUMO-2/3	C-końcowa hydrolaza, izopeptydaza	755/567-755
SENP6	SUSP1, SSP1	Nukleoplazma	SUMO-2/3	Izopeptydaza, chain editing	1112/637-1112
SENP7		Nukleoplazma	SUMO-2/3	Izopeptydaza, chain editing	984/662-984

SENP1 w porównaniu z tkanką prawidłową [46]. Wyciszenie ekspresji SENP1 zatrzymuje cykl komórkowy w fazie G1 i hamuje proliferację komórek raka jelita grubego DLD-1. Ponadto wykazano, że wyciszenie ekspresji SENP1 powoduje wzrost ekspresji inhibitorów CDKs (Cyclin-Dependent Kinases), takich jak p16, p19, p21 i p27 [47]. SENP1 prowadzi do stabilizacji białka HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor 1 α), a także VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) i indukcji procesu angiogenezy [47]. W odpowiedzi na niski poziom tlenu pobudzana jest ekspresja białek SUMO, które modyfikują HIF-1 α . Stwierdzono, że sumoilowana podjednostka HIF-1 α jest bezpośrednim sygnałem do ubikwitynowanej degradacji HIF-1 α , a enzymem odpowiedzialnym za desumoilację HIF-1 α jest SENP1. Oznacza to, że nadekspresja SENP1 może powodować nadmierną desumoilację podjednostki HIF-1 α , a tym samym zapobiegać jej degradacji i aktywować ekspresję genów odpowiedzi na niedotlenienie [40]. Badania przeprowadzone niedawno nad rakiem jajnika, potwierdziły wcześniejsze doniesienia, że proteaza SENP1 jest pozytywnym regulatorem ekspresji HIF-1 α . W badaniach tych wykazano również, że SENP1 odgrywa negatywną rolę w chemioterapii raka jajnika z zastosowaniem cisplatyny [2].

Badania wskazują, że proteaza SENP1 może odgrywać znaczącą rolę w powstawaniu i rozwoju raka gruczołu krokowego [3,12,42,43]. Nadekspresję genu *SENP1* zaobserwowano zarówno na etapie wewnątrznałonkowej neoplazji gruczołu krokowego (Prostatic Intraepithelial Neoplasia, PIN), jak i inwazyjnego raka stercza, w porównaniu do tkanek prawidłowych. W komórkach LNCaP (androgen-sensitive prostatic carcinoma cell line) zaobserwowano ponadto wzrost ekspresji SENP1 po działaniu syntetycznych androgenów i/lub interleukiny 6 (interleukin-6, IL-6). SENP1 działa jako silny aktywator czynników transkrypcyjnych AR i c-Jun, a także cykliny D1. Zdolność SENP1 do zwiększenia transkrypcji z udziałem AR jest związana z desumoilacją deacetylazy histonowej HDAC1 (histone deacetylase 1), będącej koregulatorem AR. Desumoilowana HDAC1 traci aktywność deacetylazy i zdolność do hamowania transkrypcji zależnej od AR. Ponadto, nadekspresja SENP1 wpływa na wzrost transkrypcji zależnej od c-Jun. Zatem nadekspresja SENP1 zwiększa AR-zależną i c-Jun-zależną transkrypcję oraz ekspresję cykliny D1, co zwiększa proliferację komórek gruczołu krokowego i może prowadzić do raka tego narządu. Wykazano wprawdzie, że nadekspresja SENP1 może być konieczna do utrzymania wysokiego poziomu wolnego SUMO-1, który obserwowano w prawidłowym gruczole krokowym w porównaniu do innych narządów [9]. Jednak badania wykonane na myszach transgenicznym jednoznacznie wykazały, że utrzymujący się wysoki poziom SENP1 prowadzi do transformacji gruczołu krokowego [3].

U pacjentów z rakiem stercza obserwuje się nie tylko podwyższony poziom mRNA SENP1, ale także proteazy SENP3, która przeprowadza desumoilację białek modyfikowanych przez SUMO-2/3 [5]. Indukcja SENP3 może zainicjować proces angiogenezy, ponieważ SENP3 reguluje aktywność czynnika HIF-1 α przez desumoilację jego

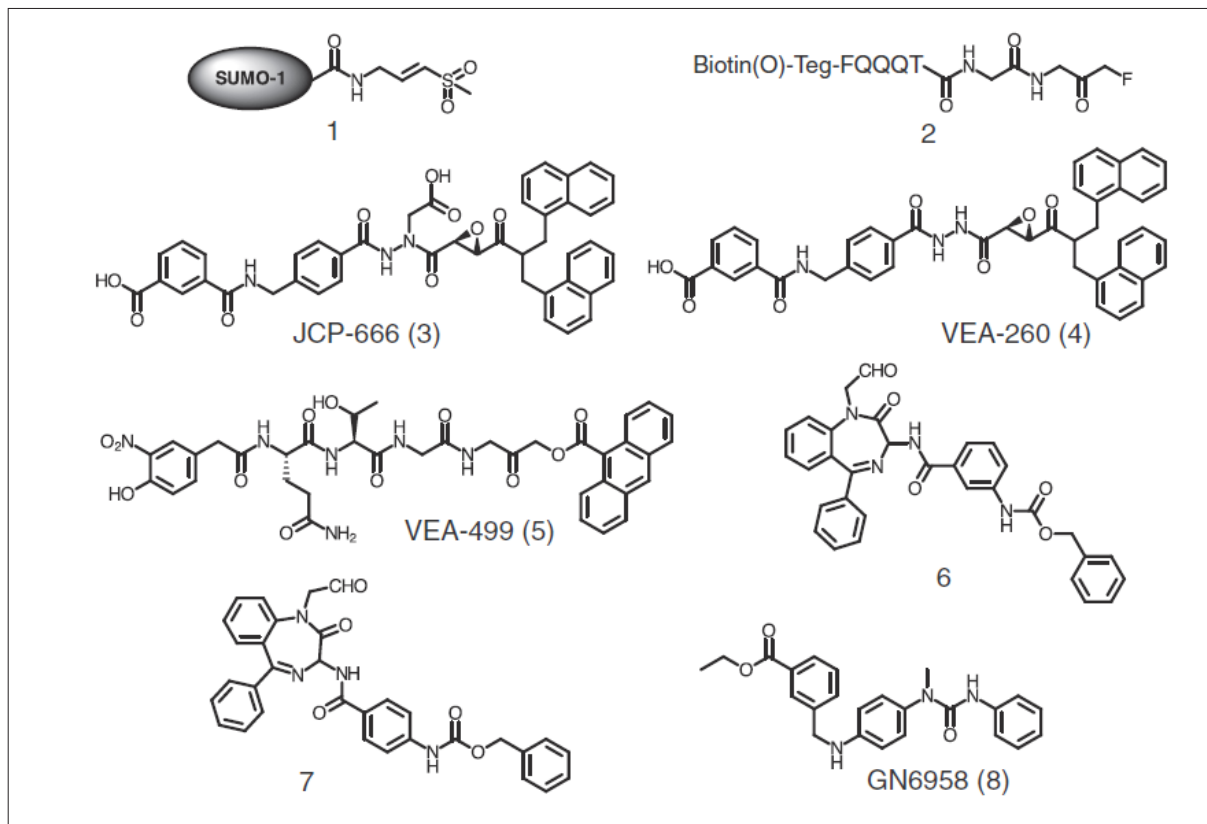
korelatora, białka p300. W ten sposób nadekspresja SENP3 powoduje wzrost ekspresji czynnika VEGF regulowanego przez HIF-1 α . Wzmocniona ekspresja SENP3 może mieć dwa źródła: mogą w niej pośredniczyć reaktywne formy tlenu (ROS), które hamują degradację SENP3. Ponadto ROS powodują wzrost poziomu białek SUMO-2/3, których dekonjugację przeprowadza SENP3. ROS wpływają też na relokalizację SENP3 z jąderka do nukleoplazmy [17]. Podobne wyniki zanotowali Sun i wsp. w komórkach płaskokomórkowego raka jamy ustnej OSCC (oral squamous cell carcinoma) [38]. Nadekspresja SENP3 może być także związana z białkiem supresorowym p19^{ARF}, które odpowiada za fosforylację, ubikwitylację, a następnie degradację SENP3 [26]. Obniżona aktywność białka p19^{ARF} obserwowana w wielu nowotworach może być zatem odpowiedzialna za wyższy poziom proteazy SENP3 [23].

Niedawne badania wykazały, że wysoka ekspresja SENP1 w komórkach raka stercza była związana z niższą ekspresją cząsteczki supresorowej microRNA-145 (miR-145) [42]; fragment 3'UTR SENP1 oddziałuje z microRNA-145; microRNA-145 powodował zatrzymanie cyklu komórkowego w komórkach linii PC-3, a także hamował rozwój guza *in vivo*. Zatem mikroRNA-145 przez oddziaływanie z SENP1 odgrywa ważną rolę w raku stercza.

Dane kliniczne wskazują, że poziom proteazy SENP1 pozytywnie koreluje z progresją i metastazą raka trzustki (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) [27]. Wyciszenie ekspresji SENP1 obniżało poziom metaloproteiny MMP-9, która ma zasadnicze znaczenie dla wzrostu i migracji komórek PDAC.

SENP2 wpływa na wzrost komórek raka wątroby (hepatocellular carcinoma, HCC) przez regulowanie stabilności β -kateniny [20]. Inne badania wykazały natomiast, że proteaza SENP2 przez hamowanie ekspresji MMP13 zatrzymuje migrację i inwazję komórek raka pęcherza [39].

W przeciwieństwie do raka stercza, w którym obserwowano wzrost ekspresji proteazy SENP1 i SENP3, w raku piersi odnotowano obniżenie poziomu mRNA SENP6 [30]. Inne badania przeprowadzone na komórkach raka piersi MCF-7 i T47D wykazały, że SENP2 hamuje aktywność transkrypcyjną receptora ER α [33]. Represja była niezależna od aktywności proteazowej SENP2, wymagała natomiast przyłączenia deacetylazy histonów HDAC3 (histone deacetylase 3). Ponadto wykazano, że SENP2 hamuje zarówno estrogenozależną, jak i estrogeniezależną proliferację komórek MCF-7. Dane przedstawione przez Nait Achour i wsp. dotyczące proteazy SENP2 identyfikują to białko jako klasyczny koregulator transkrypcji [33]. Nasze nowe badania wykazały natomiast, że zmienność genów *SENP1* i *SENP2* może wpływać na ryzyko rozwoju raka piersi [29]. Analizowane przez nas polimorfizmy *SENP1* (c.1691 + 36C > T, rs12297820) i *SENP2* (c.902C > A, p.Thr301Lys, rs6762208) prawdopodobnie nie są niezależnymi czynnikami ryzyka, ale



Ryc. 2. Wzory strukturalne inhibitorów proteaz SUMO [25]

mogą być ważnymi elementami większej grupy genów, których różne warianty polimorficzne kształtują ryzyko rozwoju raka piersi.

Badania przeprowadzone w grupie 1363 osób wykazały, że niska ekspresja SENP5 wiąże się z dobrym rokowaniem u pacjentów z rakiem piersi [10]. W komórkach raka piersi, w których wyciszono ekspresję *SENP5*, notowano także niższą ekspresję receptora transformującego czynnika wzrostu TGF- β typu I – TGF- β RI oraz metaloproteinazy MMP9, która odgrywa główną rolę w degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej i przyczynia się do inwazji raka [10]. Aktywność receptora TGF- β RI jest jeszcze regulowana przez jego sumoilację na lizynie 389 [21].

Bawa-Khalfe i wsp. [4] zaproponowali badania dotyczące roli proteaz SENP w rozwoju raku piersi. Wykazali, że dwa warianty transkryptu SENP7 – krótszy SENP7S i dłuższy SENP7L odpowiadają za poziom sumoilacji białka HP-1 α , co wiąże się z epigenetycznym reprogramowaniem komórek zachodzącym podczas transformacji nowotworowej. SENP7L prowadzi do ekspresji genów związanych z zaburzoną proliferacją i inicjuje transformację nabłonkowo-mezenchymalną (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT). Ponadto wariant ten hamuje sumoilację białka HP-1 α [4].

Nowe badania wskazały także, że proteaza SENP6 ulega zwiększonej ekspresji w komórkach raka żołądka i prowadzi do ich nadmiernej proliferacji, a jednym z jej

substratów jest czynnik transkrypcyjny FoxM1 (transcription factor forkhead box protein M1) [37].

INHIBITORY PROTEAZ SUMO

Odkrycie udziału proteaz SENP w rozwoju chorób człowieka zainicjowało poszukiwania związków, które selektywnie hamowałyby ich działanie. Jedną z pierwszych metod hamowania aktywności proteaz SENP opierała się na wykorzystaniu pełnej lub skróconej postaci białka SUMO wzbogaconego o obecność elektrofilowej pułapki zlokalizowanej na C-końcowej glicynie [16]. W jednej z metod do tego celu wykorzystano siarkoorganiczny związek – sulfon winylu (VS), który koniugowano z białkiem SUMO-1 oraz innymi białkami ubikwitynopodobnymi (związek 1 na ryc. 2). Powstały kompleks wykazywał kowalencyjne oddziaływanie z izoformą SENP2 oraz innymi enzymami aktywującymi, odpowiedzialnymi za koniugację i dekoniugację, w wyniku addycji sulfonu winylu do grupy tiolowej cysteiny wchodzącej w skład triady katalitycznej. Inkubacja SENP2 w obecności czynnika alkilującego N-etylomaleimidu (NEM) dowiodła, iż VS zapobiega powstawaniu kompleksu SUMO-1-VS-SENP2, co potwierdziło tezę, że obecność cysteiny jest niezbędna do prawidłowej katalizy tego procesu [16]. Obecność elektrofilowej pułapki wykorzystano również w przygotowaniu aktywnej sondy zawierającej fluorometyloketon przyłączony na C-końcu do swoistego peptydu (FQQQTGG) (związek 2 na ryc. 2) [13].

Inne niewielkie związki wykazujące właściwości inhibitorów proteaz SUMO zostały odkryte przez Ponder i wsp. [35]. Jednym z nich jest małowcząsteczkowy inhibitor proteazy SENP1 *Plasmodium falciparum* (PfSENP1) – JCP-666 (związek 3. na ryc. 2). Związek zawiera reaktywny aza-epoksyd połączony z peptydem szkieletowym. Jest to związek skutecznie hamujący działanie PfSENP1; IC_{50} wynosi 17,9 μM . Podobne właściwości hamujące wobec PfSENP1 wykazuje związek o symbolu VEA-260 (związek 4. na ryc. 2) pozbawiony bocznego łańcucha asparagowego w szkielecie aza-epoksydu (IC_{50} równe 16,2 μM). W toku badań dowiedziono również, że JCP-666 oraz VEA-260 z dużą skutecznością hamują działanie ludzkich proteaz SENP1 oraz SENP2 [35]. JCP-666 wykazuje IC_{50} równe 9,0 μM dla SENP1 i 4,7 μM dla SENP2 człowieka. Natomiast związek VEA-260 ma IC_{50} równe 7,1 μM dla SENP1 i 3,7 μM dla SENP2 człowieka.

Albrow i wsp., wykorzystując VEA-260, zsyntetyzowali 16 nowych cząsteczek, które analizowano wobec SENP1, 2, 5, 6 i 7 człowieka [1]. Jednak działanie nowych cząsteczek okazało się bardzo nieswoiste. Następnym 11 związków zsyntetyzowano również w oparciu o VEA-260 używając jako grupy reaktywnej acyloksymetylo ketonu (AOMK) [1]. Najbardziej efektywnym inhibitorem okazał się związek o symbolu VEA-499 (związek 5. na ryc. 2) (IC_{50} równe 3,6 μM dla SENP1 i 0,25 μM dla SENP2).

Qiao i wsp., zaprojektowali i zsyntetyzowali inhibitory SENP1 w oparciu o benzodiazepinę [36]. Najbardziej efektywnymi inhibitorami SENP1 okazały się dwa związki o numerach 6 i 7 (ryc. 2) wykazujące IC_{50} równe odpowiednio 15,5 i 9,2 μM . Związki te hamowały także wzrost komórek nowotworowych *in vitro* [36]. Związek 8. na ryc. 2 (GN6958) jest również potencjalnym czynnikiem antynowotworowym hamującym swoście aktywność SENP1 z IC_{50} równym 29,6 μM [41]. Tak więc przytoczone dane wskazują, że obecnie intensywnie poszukuje się selektywnych inhibitorów proteaz SUMO, zarówno syntetycznych, jak i pochodzenia naturalnego [18].

PODSUMOWANIE

Sumoilacja jest procesem potranslacyjnej modyfikacji białek przebiegającym z udziałem grupy niewielkich, podobnych do ubikwityny białek SUMO. Ten dynamiczny proces wpływa na zmianę stabilności, konformacji oraz umiejscowienia wielu pojedynczych cząsteczek białkowych. Tym samym sumoilacja jest ważnym mechanizmem regulującym aktywność białek w wielu procesach komórkowych. Sumoilacja białek jest modyfikacją odwracalną. Za odłączenie białka SUMO od białkowego substratu są odpowiedzialne, dzięki aktywności izopeptydazowej, swoiste proteazy cysteinowe SENP. Biorą one także udział w proteolitycznym dojrzewaniu białka SUMO, które polega na usunięciu ich C-końca i odsłonięciu dwóch reszt glicyny. Proteazy SUMO odgrywają zatem ważną rolę w utrzymaniu równowagi między sumoilacją i desumoilacją białek. Liczne badania wskazują, że zachwianie tej równowagi może doprowadzić do

rozwoju różnych chorób człowieka, w tym nowotworów złośliwych. W wielu nowotworach złośliwych obserwuje się zmiany w ekspresji proteaz SUMO. Dowody na udział proteaz SUMO w przebiegu chorób nowotworowych, czynią te białka atrakcyjnymi celami terapeutycznymi. W ciągu ostatnich dwóch dekad, dzięki zaawansowanym metodom obliczeniowym, takim jak dokowanie molekularne, udało się zidentyfikować wiele małowcząsteczkowych inhibitorów różnych izoform SENP. Należy mieć nadzieję, że niektóre z nich po dogłębnych badaniach biochemicznych, a następnie klinicznych, staną się nowymi lekami przeciwnowotworowymi.

PODZIĘKOWANIA

Autorzy składają podziękowania Pani Alicji Mireckiej za przygotowanie ryc. 1.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Albrow V.E., Ponder E.L., Fasci D., Békés M., Deu E., Salvesen G.S., Bogoy M.: Development of small molecule inhibitors and probes of human SUMO deconjugating proteases. *Chem. Biol.*, 2011; 18: 722-732
- [2] Ao Q., Su W., Guo S., Cai L., Huang L.: SENP1 desensitizes hypoxic ovarian cancer cells to cisplatin by up-regulating HIF-1 α . *Sci. Rep.*, 2015; 5: 16396
- [3] Bawa-Khalife T., Cheng J., Lin S.H., Ittmann M.M., Yeh E.T.: SENP1 induces prostatic intraepithelial neoplasia through multiple mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 25859-25866
- [4] Bawa-Khalife T., Lu L.S., Zuo Y., Huang C., Dere R., Lin F.M., Yeh E.T.: Differential expression of SUMO-specific protease 7 variants regulates epithelial-mesenchymal transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012; 109: 17466-17471
- [5] Bawa-Khalife T., Yeh E.T.: SUMO losing balance: SUMO proteases disrupt SUMO homeostasis to facilitate cancer development and progression. *Genes Cancer*, 2010; 1: 748-752
- [6] Békés M., Prudenn J., Srikumar T., Raught B., Boddy M.N., Salvesen G.S.: The dynamics and mechanism of SUMO chain deconjugation by SUMO-specific proteases. *J. Biol. Chem.*, 2011; 286: 10238-10247
- [7] Bettermann K., Benesch M., Weis S., Haybaeck J.: SUMOylation in carcinogenesis. *Cancer Lett.*, 2012; 316: 113-125
- [8] Bohren K.M., Nadkarni V., Song J.H., Owerbach D.: A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 27233-27238
- [9] Caron D., Winstall E., Inaguma Y., Michaud S., Lettre F., Bourassa S., Kelly I., Poirier G.G., Faure R.L., Tanguay R.M.: Proteomic characterization of mouse cytosolic and membrane prostate fractions: high levels of free SUMO peptides are androgen-regulated. *J. Proteome Res.*, 2008; 7: 4492-4499
- [10] Cashman R., Cohen H., Ben-Hamo R., Zilberberg A., Efroni S.: SENP5 mediates breast cancer invasion via a TGF β RI SUMOylation cascade. *Oncotarget*, 2014; 5: 1071-1082
- [11] Chen Y., Wen D., Huang Z., Huang M., Luo Y., Liu B., Lu H., Wu Y., Peng Y., Zhang J.: 2-(4-Chlorophenyl)-2-oxoethyl 4-benzamidobenzoate derivatives, a novel class of SENP1 inhibitors: virtual screening, synthesis and biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012; 22: 6867-6870
- [12] Cheng J., Bawa T., Lee P., Gong L., Yeh E.T.: Role of desumoylation in the development of prostate cancer. *Neoplasia*, 2006; 8: 667-676
- [13] Dobrotă C., Fasci D., Hădăde N.D., Roiban G.D., Pop C., Meier V.M., Dumitru I., Mătache M., Salvesen G.S., Funeriu D.P.: Glycine

fluoromethylketones as SENP-specific activity based probes. *Chem-biochem.*, 2012; 13: 80-84

[14] Drag M., Salvesen G.S.: DeSUMOylating enzymes – SENPs. *IUBMB Life*, 2008; 60: 734-742

[15] Hay R.T.: Decoding the SUMO signal. *Biochem. Soc. Trans.*, 2013; 41: 463-473

[16] Hemelaar J., Borodovsky A., Kessler B.M., Reverter D., Cook J., Kolli N., Gan-Erdene T., Wilkinson K.D., Gill G., Lima C.D., Ploegh H.L., Ovaa H.: Specific and covalent targeting of conjugating and deconjugating enzymes of ubiquitin-like proteins. *Mol. Cell. Biol.*, 2004; 24: 84-95

[17] Huang C., Han Y., Wang Y., Sun X., Yan S., Yeh E.T., Chen Y., Cang H., Li H., Shi G., Cheng J., Tang X., Yi J.: SENP3 is responsible for HIF-1 transactivation under mild oxidative stress via p300 deSUMOylation. *EMBO J.*, 2009; 28: 2748-2762

[18] Huang W., He T., Chai C., Yang Y., Zheng Y., Zhou P., Qiao X., Zhang B., Liu Z., Wang J., Shi C., Lei L., Gao K., Li H., Zhong S. i wsp.: Triptolide inhibits the proliferation of prostate cancer cells and down-regulates SUMO-specific protease 1 expression. *PLoS One*, 2012; 7: e37693

[19] Jacques C., Baris O., Prunier-Mirebeau D., Savagner F., Rodien P., Rohmer V., Franc B., Guyetant S., Malthiery Y., Reynier P.: Two-step differential expression analysis reveals a new set of genes involved in thyroid oncogenic tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2005; 90: 2314-2320

[20] Jiang Q.F., Tian Y.W., Shen Q., Xue H.Z., Li K.: SENP2 regulated the stability of β -catenin through WWOX in hepatocellular carcinoma cell. *Tumour Biol.*, 2014; 35: 9677-9682

[21] Kang J.S., Saunier E.F., Akhurst R.J., Derynck R.: The type I TGF- β receptor is covalently modified and regulated by sumoylation. *Nat. Cell Biol.*, 2008; 10: 654-664

[22] Kim J.H., Baek S.H.: Emerging roles of desumoylating enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009; 1792: 155-162

[23] Kim W.Y., Sharpless N.E.: The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell*, 2006; 127: 265-275

[24] Kumar A., Ito A., Takemoto M., Yoshida M., Zhang K.Y.: Identification of 1,2,5-oxadiazoles as a new class of SENP2 inhibitors using structure based virtual screening. *J. Chem. Inf. Model*, 2014; 54: 870-880

[25] Kumar A., Zhang K.Y.: Advances in the development of SUMO specific protease (SENP) inhibitors. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, 2015; 13: 204-211

[26] Kuo M.L., den Besten W., Thomas M.C., Sherr C.J.: Arf-induced turnover of the nucleolar nucleophosmin-associated SUMO-2/3 protease Senp3. *Cell Cycle*, 2008; 7: 3378-3387

[27] Ma C., Wu B., Huang X., Yuan Z., Nong K., Dong B., Bai Y., Zhu H., Wang W., Ai K.: SUMO-specific protease 1 regulates pancreatic cancer cell proliferation and invasion by targeting MMP-9. *Tumor Biol.*, 2014; 35: 12729-12735

[28] Matic I., van Hagen M., Schimmel J., Macek B., Ogg S.C., Tatham M.H., Hay R.T., Lamond A.I., Mann M., Vertegaal A.C.: *In vivo* identification of human small ubiquitin-like modifier polymerization sites by high accuracy mass spectrometry and an *in vitro* to *in vivo* strategy. *Mol. Cell. Proteomics*, 2008; 7: 132-144

[29] Mirecka A., Morawiec Z., Wozniak K.: Genetic polymorphism of SUMO-specific cysteine proteases – SENP1 and SENP2 in breast cancer. *Pathol. Oncol. Res.*, 2016; 22: 817-823

[30] Mooney S.M., Grande J.P., Salisbury J.L., Janknecht R.: Sumoylation of p68 and p72 RNA helicases affects protein stability and transactivation potential. *Biochemistry*, 2010; 49: 1-10

[31] Mu J., Zuo Y., Yang W., Chen Z., Liu Z., Tu J., Li Y., Yuan Z., Cheng J., He J.: Over-expression of small ubiquitin-like modifier proteases 1 predicts chemo-sensitivity and poor survival in non-small cell lung cancer. *Chin. Med. J.*, 2014; 127: 4060-4065

[32] Mukhopadhyay D., Ayaydin F., Kolli N., Tan S.H., Anan T., Kametaka A., Azuma Y., Wilkinson K.D., Dasso M.: SUSP1 antagonizes formation of highly SUMO2/3-conjugated species. *J. Cell. Biol.*, 2006; 174: 939-949

[33] Nait Achour T., Sentsis S., Teyssier C., Philippat A., Lucas A., Corbo L., Cavailles V., Jalaguier S.: Transcriptional repression of estrogen receptor α signaling by SENP2 in breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.*, 2014; 28: 183-196

[34] Owerbach D., Mckay E.M., Yeh E.T., Gabbay K.H., Bohren K.M.: A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005; 337: 517-520

[35] Ponder E.L., Albrow V.E., Leader B.A., Békés M., Mikolajczyk J., Fonović U.P., Shen A., Drag M., Xiao J., Deu E., Campbell A.J., Powers J.C., Salvesen G.S., Bogoy M.: Functional characterization of a SUMO deconjugating protease of *Plasmodium falciparum* using newly identified small molecule inhibitors. *Chem. Biol.*, 2011; 18: 711-721

[36] Qiao Z., Wang W., Wang L., Wen D., Zhao Y., Wang Q., Meng Q., Chen G., Wu Y., Zhou H.: Design, synthesis, and biological evaluation of benzodiazepine-based SUMO-specific protease 1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011; 21: 6389-6392

[37] Song J.G., Xie H.H., Li N., Wu K., Qiu J.G., Shen D.M., Huang C.J.: SUMO-specific protease 6 promotes gastric cancer cell growth via deSUMOylation of FoxM1. *Tumour Biol.*, 2015; 36: 9865-9871

[38] Sun Z., Hu S., Luo Q., Ye D., Hu D., Chen F.: Overexpression of SENP3 in oral squamous cell carcinoma and its association with differentiation. *Oncol. Rep.*, 2013; 29: 1701-1706

[39] Tan M.Y., Mu X.Y., Liu B., Wang Y., Bao E.D., Qiu J.X., Fan Y.: SUMO-specific protease 2 suppresses cell migration and invasion through inhibiting the expression of MMP13 in bladder cancer cells. *Cell Physiol. Biochem.*, 2013; 32: 542-548

[40] Ulrich H.D.: SUMO teams up with ubiquitin to manage hypoxia. *Cell*, 2007; 131, 446-447

[41] Uno M., Koma Y., Ban H.S., Nakamura H.: Discovery of 1-[4-(N-benzylamino)phenyl]-3-phenylurea derivatives as non-peptidic selective SUMO-sentrin specific protease (SENP)1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012; 22: 5169-5173

[42] Wang C., Tao W., Ni S., Chen Q., Zhao Z., Ma L., Fu Y., Jiao Z.: Tumor-suppressive microRNA-145 induces growth arrest by targeting SENP1 in human prostate cancer cells. *Cancer Sci.*, 2015; 106: 375-382

[43] Wang Q., Xia N., Li T., Xu Y., Zou Y., Zou Y., Fan Q., Bawa-Khalfe T., Yeh E.T., Cheng J.: SUMO-specific protease 1 promotes prostate cancer progression and metastasis. *Oncogene*, 2013; 32: 2493-2498

[44] Wasik U., Filipek A.: Non-nuclear function of sumoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014; 1843: 2878-2885

[45] Woo C.H., Abe J.: SUMO – a post-translational modification with therapeutic potential? *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2010; 10: 146-155

[46] Xu Y., Li J., Zou Y., Deng J., Wang L.S., Chen G.Q.: SUMO-specific protease 1 regulates the *in vitro* and *in vivo* growth of colon cancer cells with the upregulated expression of CDK inhibitors. *Cancer Lett.*, 2011; 309: 78-84

[47] Xu Y., Zuo Y., Zhang H., Kang X., Yue F., Yi Z., Liu M., Yeh E.T., Chen G., Cheng J.: Induction of SENP1 in endothelial cells contributes to hypoxia-driven VEGF expression and angiogenesis. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 36682-36688

[48] Yang X.J., Chiang C.M.: Sumoylation in gene regulation, human disease, and therapeutic action. *F1000Prime Reports*, 2013; 5: 45

[49] Yeh E.T.: SUMOylation and De-SUMOylation: wrestling with life's processes. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 8223-8227

[50] Zhao J.: Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2007; 64: 3017-3033

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.