

Received: 2012.07.09
Accepted: 2012.11.19
Published: 2013.02.26

Inhibicja aktywności proteasomu jako nowa strategia w terapii i chemioprewencji nowotworów

Proteasome inhibition as a new strategy in cancer therapy and chemoprevention

Michał Maliński, Michał Cichocki

Katedra Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie

System ubikwityna-proteasom jest jednym z głównych szlaków selektywnie degradujących białka komórkowe i regulujących większość procesów kluczowych dla zachowania homeostazy komórki. Degradacji proteasomalnej ulegają między innymi białka odpowiadające za transdukcję sygnału oraz regulację metabolizmu, cyklu komórkowego i apoptozy. Inhibicja systemu ubikwityna-proteasom powoduje zahamowanie proliferacji komórek i indukcję apoptozy, szczególnie w komórkach nowotworowych, przez co jest obiecującą strategią terapii nowotworów, potwierdzoną przez wyniki badań klinicznych. Niniejszy artykuł podsumowuje badania nad dotychczas poznanymi inhibitorami proteasomu, różniącymi się budową chemiczną i mechanizmem działania, ze szczególnym naciskiem na ich wpływ na zjawiska wewnątrzkomórkowe związane z apoptozą i regulacją cyklu komórkowego.

Słowa kluczowe:

inhibicja proteasomu, chemioterapia nowotworów, chemioprewencja, indukcja apoptozy

Summary

The ubiquitin-proteasome system is one of the main pathways involved in degradation of cellular proteins and regulation of most biochemical processes critical for maintaining cellular homeostasis. Among proteins that undergo proteasomal degradation are those involved in signal transduction, metabolism regulation, cell cycle control and apoptosis. Therefore, inhibition of the ubiquitin-proteasome system causes inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis, especially in cancer cells, which makes it a promising strategy of cancer therapy that is already supported by clinical trials. This article summarizes reports of known proteasome inhibitors, differing in chemical structure and mechanism of action, emphasizing their effects on intracellular phenomena related to apoptosis and cell cycle control.

Keywords:

proteasome inhibition, cancer chemotherapy, chemoprevention, induction of apoptosis

Full-text PDF:

<http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1035963>

Word count:

7193

Tables:

2

Figures:

2

References:

104

Adres autora: dr n. farm. Michał Cichocki, Katedra Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Święcickiego 4, 60-781 Poznań; e-mail: cichocki@ump.edu.pl

Wykaz skrótów: **CDK** – kinazy zależne od cyklin; **C-L** – aktywność kaspazopodobna; **CT-L** – aktywność chymotrypsynopodobna; **EGCG** – 3-galusan epigallokatechiny; **IGF-1** – insulinopodobny czynnik wzrostu-1; **IL** – interleukina; **IkBa** – inhibitor czynnika transkrypcyjnego kappa B; **JNK** – kinaza N-końcowa białka c-Jun; **MDR** – oporność wielolekowa; **NF-κB** – czynnik transkrypcyjny kappa B; **TL** – aktywność trypsynopodobna; **Ub** – ubikwityna; **UPS** – system ubikwityna – proteasom.

WSTĘP

Znajomość molekularnych podstaw procesów chorobowych, włączając procesy nowotworowe, pozwala na rozwój nowoczesnych metod celowanej terapii, a także strategii chemioprewencyjnych, mających na celu zapobieganie rozwojowi choroby lub wspomaganie działania czynników terapeutycznych. W patogenezie chorób degeneracyjnych i nowotworowych istotną rolę odgrywa wiele ścieżek przekazywania sygnałowego, których nieprawidłowa regulacja prowadzi do zmiany fenotypu komórki i zaburzeń tak ważnych procesów, jak regulacja cyklu, wzrostu, śmierci, różnicowania czy adhezji komórek [34,84]. Istotnym problemem w terapii nowotworów jest złożoność procesu chorobowego oraz wiele niekorzystnych cech nabywanych przez komórki w czasie progresji, które w efekcie utrudniają skuteczną terapię. W sygnalizacji komórkowej, a także w powstawaniu zaburzeń na poziomie transdukcji istotną rolę odgrywają procesy degradacji białek sygnałowych, do których zalicza się system ubikwityna-proteasom. Ze względu na to, że system ten jest zaangażowany w wiele procesów ważnych dla patogenezy i rozwoju choroby nowotworowej, jego inhibicja okazuje się racjonalnym podejściem zarówno w kontekście terapii, jak i prewencji, co potwierdza zadowalająca skuteczność inhibitorów proteasomu w badaniach klinicznych [17,55]. Skłania to badaczy do poszukiwania nowych związków, wykazujących podobne właściwości. W artykule podsumowano doniesienia dotyczące inhibitorów proteasomu o zróżnicowanej budowie chemicznej i pochodzących z różnych źródeł. W sposób szczególny zwrócono uwagę na wpływ tych substancji na zjawiska komórkowe związane z kontrolą cyklu komórkowego czy indukcją apoptozy.

SYSTEM UBIKWITYNA-PROTEASOM

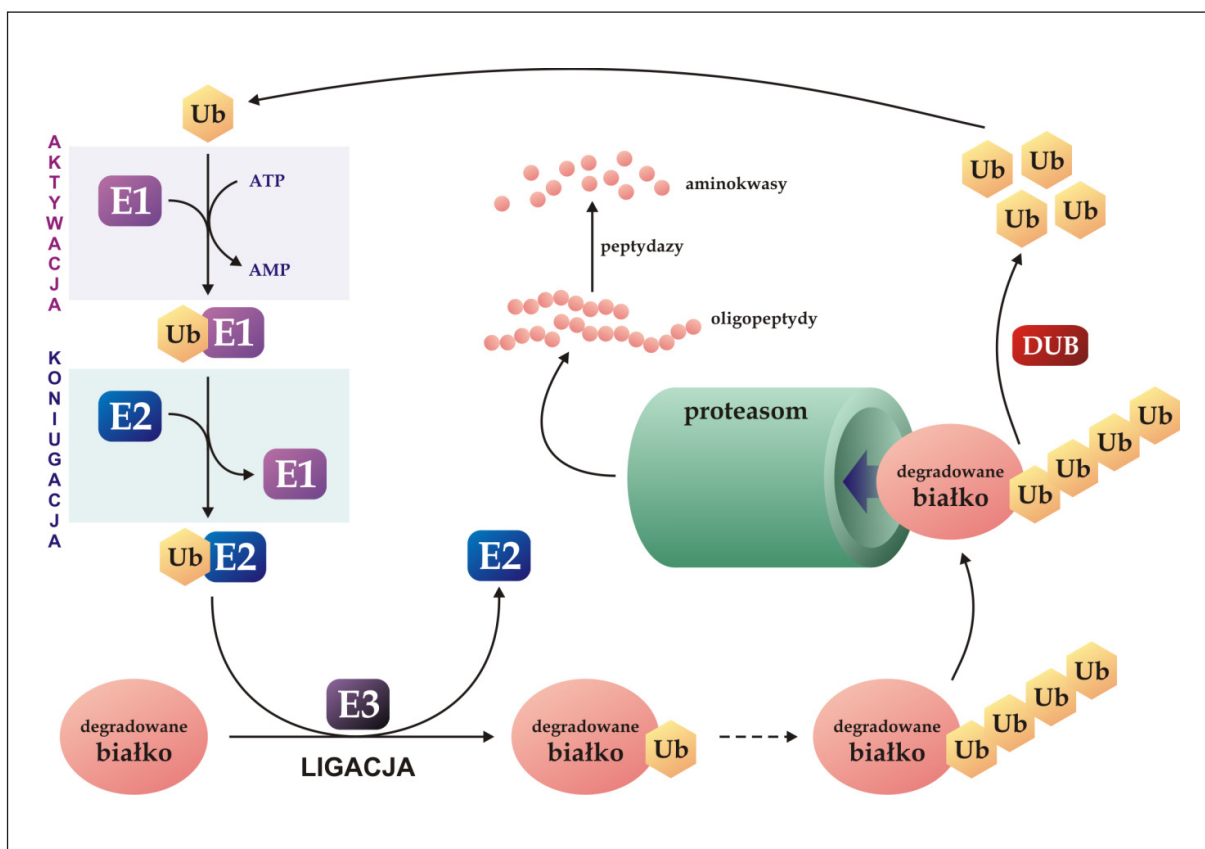
W komórkach eukariotycznych można wyróżnić dwa komplementarne procesy mające za zadanie degradację rodzimych białek wewnątrzkomórkowych: degradację lizosomalną, w tym makroautofagię oraz degradację proteasomalną. Lizosomy rozkładają głównie białka pozakomórkowe, które dostały się do wnętrza komórki poprzez endocytozę lub – w ramach ściśle regulowanej makroautofagii – białka wewnątrzkomórkowe, ale tylko w przypadku, jeśli komórka poddana jest silne-

mu stresowi (np. podczas głodzenia), bądź białka te są uszkodzone. Zadaniem makroautofagii, przeprowadzanej w autolizosomach otoczonych podwójną błoną, jest kontrolowany rozkład dużych struktur białkowych, cytosolu i organelli, w celu utylizacji wadliwej struktury i/lub pozyskania surowców strukturalnych bądź energetycznych. Proteasomy są z kolei odpowiedzialne za kontrolowaną degradację białek o niższych masach cząsteczkowych, w tym białek sygnałowych o krótkim okresie półtrwania oraz białek wadliwie sfałdowanych [29,96].

Proteasom jest główną częścią systemu określanego jako system ubikwityna-proteasom (UPS). Białka przeznaczone do degradacji proteasomalnej są najpierw rozpoznawane i oznaczane przez przyłączenie ubikwityny (Ub), niewielkiego białka złożonego z 76 reszt aminokwasowych. Proces ubikwitynylacji jest kilkietapowy i obejmuje kolejno: aktywację Ub przez enzym E1, transfer aktywnej Ub na enzym klasy E2 i dalej ligację Ub z docelowym białkiem, katalizowaną przez enzymy klasy E3. Cząsteczka Ub przyłączona do białka mającego ulec degradacji staje się następnie kolejnym substratem enzymu E3, co skutkuje powstaniem łańcucha poliubikwityny (poli-Ub). Białko z przyłączonym łańcuchem poli-Ub, złożonym z co najmniej 4 reszt Ub, jest rozpoznawane przez proteasom i po odłączeniu łańcucha poli-Ub przez enzymy deubikwitynylujące (DUB) następuje jego rozkład na oligopeptydy. Łańcuch poli-Ub jest następnie rozkładany na monomery Ub (ryc. 1) [12,26,63].

O ile E1 jest pojedynczym enzymem, klasa E2 liczy u ssaków około 40 różnych enzymów. Różnice między enzymami klasy E2 sprowadzają się do typu poliubikwitynylacji, jako że cząsteczki Ub zawierają 7 reszt lizynowych, z których każda może potencjalnie służyć jako „punkt zaczepu” dla następnej cząsteczki Ub (choć najczęściej jest to Lys48). Klasa E3 jest jeszcze szersza i liczy około 1000 wysoce swoistych enzymów, których zadaniem jest rozpoznanie określonego białka i umożliwienie jego poliubikwitynylacji [26,63].

Sam proteasom jest złożonym kompleksem białkowym o masie około 2,5 MDa i znajduje się w jądrze lub cytosolu każdej komórki eukariotycznej. Jego poszczególne

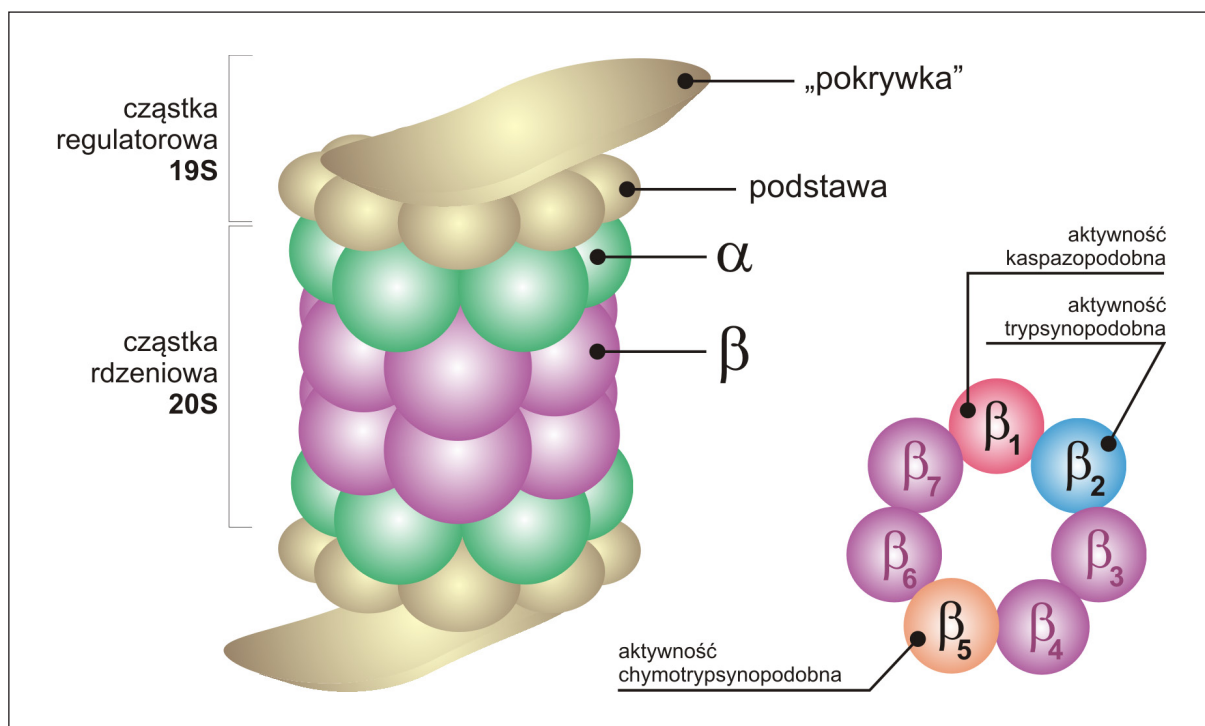


Ryc. 1 Mechanizm działania systemu ubikwityna-proteasom. Ub – ubikwityna, E1 – enzym aktywujący ubikwitynę, E2 – enzym koniugujący ubikwitynę, E3 – enzym o aktywności ligazy ubikwityna-białko, DUB – enzym deubikwitynylujący

komponenty noszą nazwy związane z ich stałą sedymentacji Svedberga. Ludzki proteasom jest określany jako 26S i składa się z rdzenia 20S o masie 670 kDa (określonego także jako proteasom 20S) oraz dwóch cząstek regulatorowych 19S (masa ~1 MDa). Rdzeń ma postać tuby złożonej z czterech pierścieni – dwa zewnętrzne pełnią rolę „bramki” i każdy z nich składa się z 7 podjednostek α , natomiast każdy z dwóch wewnętrznych złożony jest z 7 podjednostek β o aktywności katalitycznej. Cząstka regulatorowa 19S składa się z 19 podjednostek, z których 10 tworzy pierścien przylegający do rdzenia, a 9 pozostałych „pokrywkę” wiążącą łańcuch poli-Ub (ryc. 2). Zadaniem cząstki regulatorowej jest rozpoznanie łańcucha poli-Ub i rozwinięcie przyłączonego do niego białka tak, aby mogło ono wnikać do wnętrza rdzenia i tam ulec degradacji [63,86,99].

Proteasom 20S, inaczej niż typowe proteazy, ma zdolność degradacji prawie wszystkich wiązań w substracie białkowym, dzięki posiadaniu kilku aktywności peptydazowych wewnątrz jednej komory proteolitycznej [59]. Kompleks 20S jest konformacyjnie elastyczny, aktywne miejsca katalityczne umiejscowione są na wewnętrznej powierzchni cylindra, gdzie ulegają wiązaniu substraty białkowe. Aktywne miejsca katalityczne proteasomu otrzymały nazwy zależnie od swojej swoistości substra-

towej. Aktywność odpowiedzialna za rozbijanie wiązań hydrofobowych, przypominająca tą, jaką wykazuje chymotrypsyna, została nazwana aktywnością chymotrypsynopodobną (CT-L – chymotrypsin-like). Na tej samej zasadzie scharakteryzowano aktywność trypsynopodobną, której wynikiem jest rozpoznawanie reszt aminokwasów zasadowych i rozcinanie wiązań przy tych resztach (T-L – trypsin-like) oraz kaspazopodobną, działającą analogicznie, lecz dla reszt kwasowych (C-L – caspase-like lub PGPH – post-glutamyl peptide hydrolizing) [59,78]. Poza tymi dobrze poznanymi aktywnościami odkryto, iż proteasom ma jeszcze dwie: preferującą aminokwasy o rozgałęzionych łańcuchach bocznych (BrAAP – branched-chain amino acid-preferring) oraz preferującą niskocząsteczkowe aminokwasy neutralne (SNAAP – small neutral amino acid-preferring) [76]. Kolejne badania udowodniły, iż każda z wymienionych aktywności jest przyporządkowana do innej podjednostki w katalitycznej części proteasomu. Podjednostki $\beta 1$ są związane z C-L, $\beta 5$ z CT-L a $\beta 2$ z T-L [59]. Podjednostki te nie działają indywidualnie, lecz rozpad następuje jako multikatalityczna sekwencja zdarzeń. Ustalono także hierarchię aktywności proteasomu i ich znaczenie dla wzrostu komórek. Za najważniejszą z punktu widzenia przydatności, jako cel oddziaływania czynników terapeutycznych przyjęto uważać aktywność chymotrypsynopodobną, następnie trypsynopodobną, natomiast za



Ryc. 2. Struktura proteasomu 26S. Kompleks składa się z części rdzeniowej (proteasomu 20S) oraz dwóch części regulatorowych 19S. W skład proteasomu 20S wchodzi dwa pierścienie zewnętrzne (każdy złożony z podjednostek α 1– α 7) oraz dwa pierścienie wewnętrzne (każdy złożony z podjednostek β 1– β 7). Trzy spośród podtypów podjednostek β odpowiadają za trzy podstawowe aktywności proteolityczne kompleksu

najmniej ważną kaspazopodobną. Hierarchia ta została ustalona na podstawie przeżywalności mutantów z defektami poszczególnych aktywności [94]. Wydaje się jednak, że istotność hamowania poszczególnych aktywności zależy w dużej mierze od charakteru białka, które w danym przypadku ulega degradacji. Ponadto ustalono, że jednoczesne hamowanie aktywności CT-L oraz C-L znacznie podnosi efekt zablokowania proteolizy zależnej od proteasomu [39].

Proteasomy mają również swoje odpowiedniki występujące głównie w narządach układu immunologicznego, zwane immunoproteasomami i zawierające alternatywne podjednostki katalityczne β 1i, β 2i oraz β 5i. Podjednostki β 2i oraz β 5i charakteryzują się większą aktywnością proteolityczną niż ich standardowe odpowiedniki i służą do wytwarzania polipeptydów, które są następnie prezentowane jako antygeny w ramach MHC I [26,63]. Swoisty typ immunoproteasomu wykryto w grasicy i nazywa tymoproteasomem. Zawiera on jednostkę katalityczną β 5t, charakteryzującą się specyficzną aktywnością enzymatyczną. Białko to ulega ekspresji w korowej warstwie komórek epitelialnych grasicy i bierze udział w pozytywnej selekcji tymocytów [58]. Myszy pozbawione genu kodującego podjednostkę β 5t wykazują niedobór limfocytów T CD8⁺. Wydaje się, że do wytworzenia immunokompetentnych komórek cytotoksycznych T CD8⁺ niezbędne jest wytwarzanie odpowiedniego peptydu MHC I, które z kolei jest uzależnione od aktywności tymoproteasomu [65].

ZNACZENIE INHIBICJI UPS W HOMEOSTAZIE KOMÓRKOWEJ I KANCEROGENEZIE

Ze względu na to, że substratami proteasomu są zarówno białka uszkodzone, wadliwie złożone i białka sygnałowe, w tym prekursorzy białek wymagających proteolitycznej aktywacji, pełni on niezwykle istotną rolę w utrzymaniu homeostazy komórkowej.

Poprzez kontrolę poziomu białek regulatorowych w komórce proteasomy uczestniczą w regulacji jej podstawowych procesów życiowych, takich jak: progresja cyklu komórkowego, onkogeneza, transkrypcja, rozwój, wzrost, szlaki metaboliczne, selektywna degradacja uszkodzonych białek czy wytwarzanie antygenów. Nagromadzenie białek wadliwych może ostatecznie uruchomić programowaną śmierć komórki (apoptozę) lub indukować makroautofagię w ramach próby naprawy uszkodzeń [20,86,96].

Komórki nowotworowe charakteryzują się m.in. niekontrolowanym wzrostem, niewielką podatnością na apoptozę, a niekiedy podwyższoną wrażliwością na szkodliwe czynniki, co związane jest z rozregulowanym cyklem komórkowym i drastycznie przyspieszonym metabolizmem. Obecne strategie terapeutyczne mają głównie na celu wymuszenie apoptozy w tych komórkach poprzez działanie genotoksyczne lub zahamowanie ich proliferacji [32].

Do białek degradowanych przez UPS należą białka proapoptotyczne z rodziny Bcl-2, ujemne regulatory cyklu

Tabela 1. Substraty proteasomu 26S

Rodzaj substratu	Przykład	Funkcja
Cykliny i białka spokrewnione z cyklinami	cykliny A, B, D, E inhibitory zależne od cyklin (CDK): p27, p21	progresja cyklu komórkowego regulacja aktywności kinaz cyklicznych
Supresory onkogenezy	p53 Rb	czynnik transkrypcyjny inhibitor E2F
Onkogeny	c-fos/c-jun c-myc N-myc	czynnik transkrypcyjny czynnik transkrypcyjny czynnik transkrypcyjny
Białko inhibitorowe	IκB p130	inhibitor NF-κB inhibitor E2F-1
Enzymy	fosfataza cdc25 aminotransferaza tyrozyny (TAT)	CDK1/cykliny B fosfataza metabolizm Tyr
Czynniki pro- i antyapoptotyczne	XIAP Bax Bcl-2	inhibitor apoptozy czynnik proapoptotyczny inhibitor apoptozy
Inne	Ki-67	degradacja jądrowego antygeny komórek proliferujących (PCNA)

komórkowego (p53, p21Waf1/Cip1, p27Kip1) i inne elementy sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, takie jak inhibitor czynnika transkrypcyjnego NF-κB, białko IκB (tabela 1). Inhibicja systemu UPS prowadzi zatem do stabilizacji wielu istotnych czynników proapoptotycznych [86,95].

Uwzględniając to, że aktywność proteasomu 26S w komórkach nowotworowych jest najczęściej podwyższona, co stanowi swoistą ochronę tych komórek przed apoptozą, inhibicja UPS wydaje się obiecującą strategią terapii przeciwnowotworowej [6,92], która obecnie przynosi wymierne efekty, zarówno w badaniach laboratoryjnych, jak i klinicznych. Indukcję apoptozy i zahamowanie cyklu komórkowego wiąże się głównie z zahamowaniem aktywności CT-L proteasomu [62].

Skutki inhibicji proteasomów

Wiele podstawowych procesów komórkowych jest związanych z funkcjonowaniem proteasomu i szlaku UPS, w związku z czym inhibicja proteasomu wpływa na wzrost komórek, regulację cyklu komórkowego i apoptozę. Niżej podano przykłady skutków inhibicji proteasomu 26S.

Wpływ na wzrost komórek i procesy starzenia

Inhibicja proteasomu obniża transkrypcję głównych cząsteczek związanych z kaskadami sygnałowymi, związanymi ze wzrostem i przeżyciem komórek, np. następuje obniżenie ekspresji insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF-1), jego receptora (IGF-1R)

i cząsteczek regulujących (np. substrat receptora insulinowego IRS-1). Szlak sygnalizacji związany z IGF-1 promuje wzrost komórek w niektórych nowotworach (np. w szpiczaku mnogim), ich przeżycie i oporność na niektóre leki. IGF-1 jest wytwarzany przez komórki gospodarza czynnikiem wzrostu umożliwiającym wędrowkę komórek nowotworowych podczas metastazy. Podobnie jak interleukina 8 (IL-8) i histamina, IGF-1 może powodować zmiany kształtu komórek, rearanżację cytoszkieletu, zmiany w adhezji komórek i płynności błon, umożliwiające powstanie przerzutów. Szlaki sygnalizacyjne związane z insuliną i czynnikiem IGF-1 odgrywają także istotną rolę w procesach starzenia. Stymulacja komórek za pomocą IGF-1 powoduje wzrost aktywności proteasomu [49]. Wydaje się, że odpowiedni poziom IGF-1 odgrywa zatem rolę w zależnym od proteasomu usuwaniu utlenionych białek w komórkach nerwowych. IGF-1 prawdopodobnie wpływa na aktywność proteasomu poprzez szlak kinazy mTOR. Zahamowanie aktywności proteasomu może być zatem zarówno konsekwencją, jak i jedną z przyczyn procesów starzenia.

Wpływ na apoptozę

Inhibicja proteasomu wpływa istotnie na proces apoptozy. Istnieje przynajmniej pięć mechanizmów apoptozy, związanej z regulacją systemu proteasomu 26S. Po pierwsze, obniżenie aktywności proteasomu prowadzi do podwyższenia poziomu białka inhibitorowego liganda Fas (FLIP), co sprzyja apoptozie, przez zwiększenie aktywacji kaspazy 8. Drugi mechanizm nie wiąże się bezpośrednio z inhibicją proteasomu, lecz z ochro-

na degradacji białka BAX poprzez jego dimeryzację (podczas gdy w prawidłowych komórkach jest ono monomeryczne). BAX przemieszcza się wtedy do wnętrza mitochondrium, sprzyjając uwalnianiu cytochromu c i drugiego mitochondrialnego aktywatora kaspazy, SMAC. To prowadzi do aktywacji kaspazy 9 i tworzenia apoptosomu [103]. Trzeci mechanizm związany jest z hamowaniem degradacji białka IκB, co z kolei hamuje aktywność transkrypcyjną czynnika transkrypcyjnego NF-κB i prowadzi do obniżenia ekspresji białek antyapoptotycznych, takich jak Bcl-2, A1 oraz inhibitora kaspazy 9 XIAP [74]. Prowadzi to w konsekwencji do uwolnienia cytochromu c do cytosolu i aktywacji kaskady kaspaz, stymulując apoptozę. Kolejny szlak apoptozy związany jest z nagromadzeniem innych substratów proteasomu, takich jak: kinaza JNK i czynnik c-myc. Stabilizacja JNK prowadzi do zwiększonej fosforylacji c-Jun i podnosi zdolność wiązania się AP-1 do DNA, co prowadzi do podwyższonej ekspresji receptora śmierci Fas. Jednocześnie wzrasta również ekspresja FasL, zależna od czynnika transkrypcyjnego c-myc, który również gromadzi się wskutek inhibicji proteasomu. Przyłączenie FasL do Fas uaktywnia kaspazę 8, która jest główną kaspazą apoptozy, prowadząc nieuchronnie do kontrolowanej śmierci komórki. Wreszcie, inhibicja proteasomu skutkuje zwiększeniem poziomu białka p53, które z kolei powoduje wzrost ekspresji wielu czynników proapoptotycznych (np. Bax) i obniża ekspresję czynników antyapoptotycznych. Białko p53 wpływa również na przebieg cyklu komórkowego poprzez transaktywację białka p21 [67].

Wynika z tego, że inhibicja proteasomu może indukować apoptozę zarówno przez aktywację szlaku mitochondrialnego (wewnątrzkomórkowego), jak i receptorowego (zewnętrznykomórkowego).

Wpływ na cykl komórkowy

Degradacja cyklin zależna od proteasomu jest jednym z głównych mechanizmów odpowiedzialnych za regulację cyklu komórkowego. Zależne od cyklin kinazy CDK wiążą się do cyklin, które ulegają ekspresji tylko w specyficznych momentach cyklu, tworząc enzymatyczny kompleks cyklina/CDK. Kompleks ten jest kontrolowany przez inhibitory CDK: p21WAF1 i p27KIP1,19, które są substratami proteasomu. Inhibicja proteasomu skutkuje nagromadzeniem inhibitorów CDK, co prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego [77,78].

Wpływ na pompy błonowe i zjawisko oporności wielolekowej (MDR)

Zjawisko oporności wielolekowej w komórkach nowotworowych związane jest z nadmierną aktywnością glikoproteiny P (MDR1), wypompowującej leki poza komórkę, co skutecznie zmniejsza ich stężenie i tym samym efektywność terapii. Wykazano, że proteasom 26S bierze udział w procesie dojrzewania glikoproteiny P [91].

W niektórych badaniach stwierdzono, że inhibitory proteasomów zmniejszają aktywność transporterów błonowych z rodziny ABC (ATP-binding cassette), do których należy glikoproteina P (PgP). Taką aktywność wykazywał syntetyczny peptyd MG132 w komórkach raka żółtaka linii SGC7901/VCR [104]. Wcześniej wykazano, że zarówno MG132, jak i bortezomib hamuje aktywność PgP poprzez szlak kinaz MAP i czynnika NF-κB w komórkach raka piersi MCF7 [25]. Podobne działanie bortezomibu w liniach wykazujących nadekspresję MDR1, KB 8-5 i K 562/i-S9 wykazano w badaniach Panischevej i wsp., wskazując jednak na oddziaływanie tego leku na białko YB-1 [69]. Takie działanie inhibitorów proteasomu sugeruje ich zastosowanie w terapii skojarzonej w celu zwiększenia efektów i obniżenia zjawiska oporności wielolekowej.

Możliwość indukcji makroautofagii i ekspresji białek szoku cieplnego

Z powodu roli, którą proteasomy pełnią w homeostazie komórki, ich inhibicja może uruchomić mechanizmy adaptacyjne zwiększające szanse komórki na przeżycie.

Inhibitory proteasomu prowadzą do wzrostu transkrypcji genów kodujących białka z rodzin HSP90, HSP70, HSP40, HSP28, HSP apg-1 i mitochondrialnego HSP75. Białka te, należące do białek opiekuńczych (chaperons), pełnią znaczącą rolę w rozwijaniu się mechanizmów oporności na związki terapeutyczne. Komórki nowotworowe traktowane inhibitorami proteasomu dążą do kompensowania obniżonej aktywności tej proteazy przez zwiększanie jej syntezy i syntezy cząsteczek chaperonowych. Takie zachowanie może być dowodem na niezbędność proteasomu do przeżycia komórki oraz sugerować możliwość użycia inhibitorów chaperonów w celu wzmocnienia terapii inhibitorami proteasomów [53].

Innym zjawiskiem obserwowanym w inhibicji proteasomów jest indukcja autofagii, jako komplementarnego procesu niszczenia wadliwych struktur białkowych i odzysku aminokwasów. Chociaż intensywne autofagia może równie dobrze prowadzić do autofagicznej śmierci komórki, indukcja autofagii w komórkach nowotworowych jest powszechnie uważana za zjawisko niepożądane, dzięki któremu komórka nowotworowa może pozbyć się uszkodzonych struktur i pozyskać dodatkowe substraty budulcowe i energetyczne. Zahamowanie aktywności proteasomu skutkuje akumulacją ubikwitynowanych białek, które mogą tworzyć agregaty zwane agresomami, rozkładane w procesie autofagii poprzez aktywację HDAC6, a także indukcją stresu siateczki śródplazmatycznej, co skutkuje aktywacją szlaku IRE1-JNK. Inhibicja proteasomu powoduje też inhibicję mTOR, stabilizację ATF4 oraz akumulację LC3. Wszystkie te zjawiska mogą prowadzić do indukcji makroautofagii [96].

Należy też wziąć pod uwagę możliwość, że mała toksyczność inhibitorów proteasomu w komórkach nienowotwo-

rowych może mieć związek z ich lepszymi możliwościami adaptacyjnymi oraz indukcją powyższych zjawisk na większą skalę.

INHIBITORY PROTEASOMU 20S – KLASYFIKACJA I PRZEGLĄD

Aldehydy peptydowe

Działanie aldehydów peptydowych opiera się na reakcji grupy aldehydowej z grupą hydroksylową reszty treoniny w miejscu aktywnym proteasomu, czego skutkiem jest powstanie hemacetalowego adduktu. W warunkach fizjologicznych reakcja ta jest odwracalna, ponadto aldehydy szybko ulegają utlenieniu do odpowiednich kwasów karboksylowych niezdolnych do inhibicji i usuwanych z komórki w ramach zjawiska oporności wielolekowej [90]. Poważną wadą aldehydów peptydowych jest ich nieswoistość, ponieważ wywołują również inhibicję proteaz serynowych i cysteinowych, takich jak kalpaina i katepsyna B [79]. Z tego względu znajdują one zastosowanie głównie jako „narzędzia” w biologii molekularnej.

Do grupy tej należy m.in. syntetyczny peptyd MG-132 (Z-Leu-Leu-Leu-CHO), wykazujący silną inhibicję aktywności CT-L [90]. Wykazano, że uwrażliwia on komórki raka prostaty linii PC3-TR i LNCaP niewrażliwe na TRAIL, ligand receptorów śmierci DR4 i DR5, prowadząc do ich apoptozy. Jednocześnie ani MG-132, ani TRAIL, ani też kombinacja tych dwóch czynników nie wywołuje apoptozy w komórkach linii 293T i BPH-1, zatem działanie sensytyzujące MG-132 wydaje się selektywne w stosunku do złośliwych komórek nowotworowych [46]. Inne badania wykazały indukujący wpływ MG-132 na sygnalizację BMP w komórkach nowotworowych linii gruczolaka TMK1, a także jelita grubego SW1116 oraz HT-29, czego skutkiem jest zwiększenie ekspresji genów p21Waf1/Cip1, p27Kip1 oraz kilku naturalnych ligandów receptora BMP i konsekwentnie zmniejszenie proliferacji wspomnianych komórek [97,98]. Istnieją doniesienia, że MG-132 może indukować apoptozę neuronów dopaminergicznych, co zostało zaobserwowane w linii immortalizowanych neuronów N27 oraz w modelu zwierzęcym myszy C57 (bezpośrednie podanie domózgowe) i ma związek z aktywacją kaspazy 3. Przypuszcza się, że zaburzenia aktywności proteasomu w neuronach dopaminergicznych mogą mieć znaczenie w patogenezie choroby Parkinsona [87].

Tyropeptyna A, związek wyizolowany z pożywki hodowlanej bakterii *Kitasatospora* sp. hamuje aktywność CT-L oraz T-L (IC50 odpowiednio 0,1 i 1,5 µg/mL), nie hamuje jednak aktywności C-L nawet przy stężeniu rzędu 100 µg/mL. Tyropeptyna B, będąca związkiem o bardzo zbliżonej budowie wykazuje aktywność dwukrotnie mniejszą [56,90]. Zsyntetyzowano kilka pochodnych tyropeptyny A, z których dwie okazały się mieć szczególnie właściwości. TP-104 wykazuje 20-krotnie silniejszą inhibicję CT-L niż związek macierzysty, natomiast TP-110

jest swoistym inhibitorem aktywności CT-L, tj. wykazującym brak inhibicji pozostałych aktywności enzymatycznych proteasomu [57].

Fellutamid B wyizolowano z *Penicillium fellutanum*; ze względu na pewne podobieństwo strukturalne do MG-132 został przebadany jako inhibitor proteasomu i okazało się, że szczególnie silnie hamuje aktywność CT-L (IC50 = 9,4 nM), a także aktywności T-L i C-L (IC50 odpowiednio 2,0 i 1,2 µM) [90]. Ostatnie badania wskazują także na wyjątkowo silną inhibicję proteasomu *Mycobacterium tuberculosis*, co może sugerować potencjalne zastosowanie fellutamidu B jako leku przeciwgruźliczego [47].

Peptydowe pochodne kwasu boronowego

Niestabilność i nieselektywność aldehydów peptydowych stała się powodem poszukiwań innej grupy funkcyjnej zdolnej do inhibicji proteasomu, co ostatecznie doprowadziło do syntezy boronianów peptydowych. Mimo iż wiązanie między grupą boronianową a N-końcową resztą treoniny proteasomu nie ma charakteru kowalencyjnego, inhibitory proteasomu zawierające grupę boronianową wykazują dużą aktywność i selektywność. Uważa się, że atom boru przyjmuje wolną parę elektronową tlenu pochodzącego z reszty treoniny, co pozwala na uzyskanie stabilnej struktury tetraedrycznej. Peptydowe pochodne kwasu boronowego są też wolniej usuwane przez mechanizm oporności wielolekowej, niż aldehydy peptydowe [90].

Bortezomib (Velcade™, PS-341) jest pierwszym inhibitorem proteasomu dopuszczonym w 2003 r. w trybie przyspieszonym przez Food and Drug Administration do terapii pacjentów ze szpiczakiem mnogim (MM) w stadium progresji. Dzięki zadowalającej skuteczności w 2005 r. uzyskał regularną rekomendację FDA [37].

Skuteczność bortezomibu jest szczególnie widoczna w połączeniu z konwencjonalnymi chemioterapeutykami, deksametazonem lub radioterapią [77]. Silny efekt chemioutczulający bortezomibu zaobserwowano w połączeniu z chemioterapeutykami, takimi jak melfalan czy doksorubicyna w licznych liniach komórkowych szpiczaka mnogiego. Mechanizm działania powiązany jest z inhibicją NF-κB i transkrypcją licznych czynników antyapoptotycznych: Bcl-2, A1, XIAP i FLIP [53,54]. Bortezomib indukuje także apoptozę w kilku rodzajach złośliwego chłoniaka, zarówno *in vitro* jak i u pacjentów [35]. Skuteczność bortezomibu nie ogranicza się jednak do nowotworów hematologicznych. Jedne z pierwszych doniesień dotyczących chemiosensytyzacji przez bortezomib pochodzą z badań na liniach komórkowych raka jelita grubego oraz ksenograftach u myszy, gdzie chemioterapeutyką był czynny metabolit irinotekanu [18]. Analogiczne badania wykonano również na liniach komórkowych raka trzustki BxPC3 [83]. Badania przeprowadzone na dwóch liniach komórkowych siatkowiec WERI-Rb1 i Y72 (IC50 odpowiednio 4,4

i 10 nM) wykazały wzrost ekspresji p53, p21 i p27, indukcję apoptozy i chemiosensytyzację na dokсорubicynę [73]. Badania aktywności bortezomibu *in vitro* w liniach komórkowych raka rdzeniastego i anaplastycznego tarczycy wskazują na jego działanie proapoptotyczne w stężeniach zbliżonych do osiągalnych klinicznie. Zaobserwowano także osłabienie aktywności bortezomibu w obecności IGF-1, co wskazuje, że aktywność osi sygnałowej IGF-1/Akt może działać przeciwstawnie do inhibicji proteasomu [52]. Sugeruje się, że obiecującą strategią chemioterapii mogłoby być połączenie bortezomibu z TRAIL, ligandem receptorów śmierci charakteryzującym się brakiem większego wpływu na komórki nienowotworowe [82].

Bortezomib nie jest jednak pozbawiony działań niepożądanych – do najczęstszych należą trombocytopenia, neutropenia, anemia i neuropatia obwodowa [35]. Istotnym problemem klinicznym jest także nabywanie oporności na bortezomib stosowany w monoterapii. Z badań *in vitro* wynika, że ma to najprawdopodobniej związek z nadekspresją i/lub mutacją genu kodującego jednostkę $\beta 5$ – z linii komórkowych białaczki THP1 oraz Jurkat wyprowadzono linie odporne na bortezomib, natomiast linia K562 wykazująca naturalną nadekspresję podjednostki $\beta 5$ jest bardziej odporna na bortezomib w porównaniu do innych linii białaczki i szpiczaka. Inną przyczyną nabywania oporności, niezależną od aktywności proteasomu, może być nadekspresja białek chaperonowych, jak Bip czy HSP20, co zostało zaobserwowane w badaniach na liniach międzybłoniaka i chłoniaka [80].

CEP-18770 jest syntetycznym boronianem peptydowym, charakteryzującym się aktywnością przy podaniu doustnym i podobnym profilem i siłą inhibicji proteasomu jak bortezomib. CEP-18770 indukuje apoptozę i hamuje aktywność NF- κ B wywołaną TNF- α w licznych liniach komórkowych szpiczaka mnogiego, a także ksenograftach w modelu mysim. Związek ten charakteryzuje się także mniejszą cytotoksycznością niż bortezomib w stosunku do nienowotworowych komórek krwi i szpiku kostnego [72]. Dalsze badania nad CEP-18770 wskazują na jego synergistyczne działanie w połączeniu z bortezomibem lub melfalanem w liniach komórkowych szpiczaka mnogiego, a także dużą skuteczność w modelach mysich ksenograftów (zarówno przy podaniu *i.v.* jak i *p.o.*). Ponadto, progresja LAGk-1B – guzów opornych na bortezomib czy CEP-18770 podawanych pojedynczo – postępuje dwukrotnie wolniej przy podaniu obu tych inhibitorów jednocześnie [81]. Może to sugerować inny mechanizm działania tego inhibitora, wspomagający działanie bortezomibu.

Duża skuteczność boronianów peptydowych sprawiła, że podjęte zostały próby syntezy związków opartych na innych efektywnych inhibitorach proteasomu, ale zawierających grupę boronianową jako grupę funkcyjną. Spośród boropochodnych tyropeptyn z dodatkowymi podstawnikami przy N-końcu na szczególną uwagę zasługują dwie:

N-3-fenoksyfenyloacetylowa oraz N-3-fluoropikolinowa. Ta pierwsza jest ponad 9-krotnie silniejszym inhibitorem aktywności CT-L niż bortezomib (IC₅₀ odpowiednio 4,1 i 39 nM), wykazuje jednak mniejszą cytotoksyczność w stosunku do komórek szpiczaka linii RPMI8226. Druga z pochodnych charakteryzuje się z kolei wyższą cytotoksycznością niż bortezomib (IC₅₀ odpowiednio 4,9 i 8,8 nM), lecz jest słabszym inhibitorem aktywności CT-L [93].

β -laktony

Laktacystyna jest metabolitem bakterii z rodzaju *Streptomyces* i historycznie pierwszym związkiem pochodzenia naturalnego opisanym jako inhibitor proteasomu, odkrytym i wyizolowanym jako inhibitor wzrostu mysiej linii komórkowej nerwiaka płodowego, Neuro-2a oraz induktor rozrostu neurytów tej linii komórkowej. Laktacystyna powoduje także zatrzymanie cyklu komórkowego w linii kostniakomięsaka MG-63 [23,24]. Omuralid, β -laktan clasto-laktacystyny, zidentyfikowany później jako jej aktywny metabolit, hamuje wszystkie trzy aktywności proteasomu przez utworzenie acylowego adduktu z resztą treoniny w miejscu aktywnym podjednostki β . Charakter inhibicji aktywności CT-L i T-L jest nieodwracalny. Oba związki określa się jako wysoce specyficzne inhibitory proteasomu, niemające wpływu na inne proteazy, ani na aktywność lizosomów. Obserwuje się także zmniejszoną prezentację antygenów w ramach MHC I [16,23]. W kulturach komórek granularnych mózdzka pochodzących od szczurów rasy Wistar, laktacystyna indukuje apoptozę poprzez aktywację kaspazy 3 [71]. Podobny skutek uzyskano w kulturach mysich embrionalnych neuronów kory mózgowej, przy czym zaobserwowano również zwiększenie poziomu białka szoku cieplnego HSP70, a ponadto nasilenie ekspresji genów HSP47 i HSP22. Badania powtórzono na komórkach PC-12 transfekowanych HSP22 w celu jego nadekspresji i inkubowanych z MG-132. Efektem było zwiększenie ich przeżywalności o 25%, co dodatkowo potwierdza indukcję mechanizmów cytoprotekcyjnych w odpowiedzi na inhibicję proteasomu [102].

Salinosporamid A (Marizomib, NPI-0052) jest wtórnym metabolitem morskiej bakterii *Salinispora tropica*, nieodwracalnie hamującym aktywność CT-L przy niskich stężeniach nanomolowych. W badaniach aktywności na izolowanym proteasomie 20S pochodzącym od drożdży i królików IC₅₀ wynoszą odpowiednio 1,9 i 2,6 nM, co czyni salinosporamid A jednym z silniejszych znanych inhibitorów proteasomu pochodzenia naturalnego. Badania wykazują dobrą skuteczność salinosporamidu A w modelu ksenograftów szpiczaka mnogiego u myszy. Wiele badań przedklinicznych wskazuje na potencjalne zastosowanie salinosporamidu A w nowotworach hematologicznych: szpiczaku mnogim, makroglobulinemii Waldenströma, ostrej białaczce szpikowej i limfatycznej, przewlekłej białaczce limfatycznej oraz chłoniakach nieziarniczych, a także nowotworach trzustki i jelita grubego [90].

Salinosporamid A w połączeniu z bortezomibem, a także z wieloma chemioterapeutykami wykazuje synergizm działania. Udokumentowany jest także wpływ salinosporamidu A na inhibicję NF- κ B. Obecnie salinosporamid A znajduje się w I fazie badań klinicznych jako pojedynczy chemioterapeutyk w leczeniu szpiczaka mnogiego, chłoniaków i guzów litych [30]. Jest dobrze tolerowany, jedynym efektem niepożądanym są halucynacje. Istotną wadą salinosporamidu A jest jego krótki okres półtrwania u ludzi, wynoszący około 5 minut [80].

W poszukiwaniu jeszcze silniejszych inhibitorów proteasomu zsyntetyzowano wiele pochodnych salinosporamidu A, żadną jednak, włączając w to pochodną fluorową, nie wykazała silniejszego działania. Innymi silnymi inhibitorami proteasomu pochodzenia naturalnego spokrewnionymi z salinosporamidem A są cynabaramid A (IC₅₀ = 1 nM) oraz antyprotealid, będący naturalną hybrydą salinosporamidu A i omuralidu [90].

Belaktozyny A i C wyizolowane ze *Streptomyces sp.* wykazują profil działania podobny do omuralidu. Ich hamujący wpływ na cykl komórkowy komórek HeLa S3, związany z zatrzymaniem cyklu na granicy faz G2/M, opisano jeszcze przed odkryciem zdolności hamowania aktywności proteasomu [7]. Dalsze badania wykazały, że hamowanie aktywności kompleksów cykliny A1-Cdc2 oraz cykliny A1-Cdc28 ma charakter pośredni i jest skutkiem inhibicji aktywności CT-L proteasomu 20S (IC₅₀ obu związków 0,21 μ M). Ponadto zaobserwowano większą aktywność benzylowego estru belaktozyny A, KF33955 (IC₅₀ = 48 nM), a także znacznie silniejsze działanie antyproliferacyjne na komórki HeLa S3 (IC₅₀ = 0,46 μ M; IC₅₀ belaktozyny A = 51 μ M), co przypisuje się jego lepszej przenikalności przez błonę komórkową. Analog ten powoduje także wzrost poziomu p53 oraz p27 [8].

Spśród pochodnych belaktozyny C warto wyróżnić dwa związki różniące się głównie obecnością grupy boronianowej zamiast ugrupowania β -laktonowego, hamujące aktywność CT-L proteasomu 20S przy IC₅₀ 0,28 i 0,51 μ M. Pierwszy z nich wywołuje zatrzymanie cyklu w fazie G2/M oraz indukuje apoptozę w komórkach linii HeLa S3 przy stężeniach >1 μ M, jednak bortezomib wywołuje porównywalny efekt w stężeniu 100-krotnie mniejszym [60].

Epoksyketony

Mechanizm działania α,β -epoksyketonów opiera się na tworzeniu morfolinowego adduktu z resztą treoniny w miejscu aktywnym proteasomu. Związki tej grupy są wysoce specyficznymi inhibitorami proteasomu i nieodwracalnie hamują jego aktywność, przy niższych stężeniach wykazując także znaczną selektywność w stosunku do aktywności CT-L [28]. Epoksomycyna, opisana po raz pierwszy w 1992 jako metabolit niedyferentowanego szczepu promieniowców, wykazuje

silne działanie cytotoksyczne *in vitro* na mysie komórki czerniaka linii B16 oraz białaczki P388, a także ludzkie komórki raka jelita linii HCT-116 i Moser oraz białaczki szpikowej K562 (IC₅₀ odpowiednio 2, 2, 5, 44, 37 ng/ml). Badania *in vivo* na myszach z wszczepionymi komórkami linii B16 i P388 wykazały dużą skuteczność jedynie w stosunku do pierwszej z nich [31]. W 2000 r. epoksomycyna została scharakteryzowana jako nieodwracalny, wysoce selektywny inhibitor proteasomu [28].

Carfilzomib (PR-171) jest syntetycznym epoksyketonem z dobrze udokumentowanym działaniem proapoptotycznym *in vitro* w liniach komórkowych szpiczaka mnogiego (ANBL-6, KAS-6/1, RPMI 8226, U266, H929). Charakteryzuje się wysoką selektywnością inhibicji aktywności CT-L (ponad 80% inhibicji przy stężeniu 10 nM, brak większego wpływu na pozostałe aktywności poniżej stężenia 100 nM). W komórkach traktowanych carfilzomibem obserwuje się aktywację JNK, fragmentację DNA, spadek potencjału błony mitochondrialnej i zwiększoną aktywność obu szlaków indukcji apoptozy. W porównaniu z bortezomibem, carfilzomib okazuje się silniejszym czynnikiem proapoptotycznym. Wykazuje również dużą skuteczność w liniach komórkowych oraz próbkach guzów opornych na bortezomib [44]. Przypadek carfilzomibu wydaje się podkreślać szczególną rolę aktywności CT-L proteasomu w przeżyciu komórek nowotworowych, przynajmniej w odniesieniu do nowotworów hematologicznych [70]. W pierwszych badaniach klinicznych u pacjentów z nawrotami nowotworów hematologicznych różnego typu, carfilzomib wykazał zadowalającą efektywność i bezpieczeństwo stosowania. Nie wywołuje neuropatii obwodowych jak bortezomib, zaobserwowano natomiast zmęczenie, mdłości i trombocytopenię. Aktywność przeciwnowotworową zaobserwowano przy dawkach \geq 11 mg/m², a maksymalną tolerowaną dawkę ustalono na 15 mg/m². Biologiczny okres półtrwania carfilzomibu wynosi około 30 minut [66].

ONX-0912 jest tripeptydem z ugrupowaniem epoksyketonowym o sile i selektywności działania porównywalnej z carfilzomibem, a ponadto aktywnym przy podaniu doustnym. W liniach komórkowych szpiczaka mnogiego wykazuje synergizm działania z bortezomibem, deksametazonem, lenalidomidem oraz MS-275 (inhibitorem deacetylazy histonów). ONX-0912 indukuje apoptozę poprzez aktywację kaspazy 3, 8, 9 oraz PARP, przedłuża także życie myszy z ksenograftami szpiczaka mnogiego. Badania na liniach MM.1S oraz HUVEC sugerują, że inhibitor ten może hamować migrację komórek do krwi obwodowej oraz angiogenezę [9].

Syrbaktyny

Inhibitory tej grupy zawierają makrocykliczny układ laktamowy zawierający wiązanie nienasycone, któ-

re uczestniczy w tworzeniu kowalencyjnego wiązania z resztą treoniny w miejscu katalitycznym podjednostki β proteasomu. Syryngolina A jest metabolitem bakteryjnym *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, scharakteryzowanym jako inhibitor proteasomu hamujący nieodwracalnie jego trzy główne aktywności katalityczne. Glidobaktyna A, metabolit bakterii z rzędu *Burkholderiales*, różniąc się od syryngoliny A głównie obecnością długiego lipofilowego łańcucha bocznego, wykazuje większą aktywność i znikomy wpływ na inhibicję aktywności C-L. Półsyntetyczna pochodna syryngoliny A zawierająca podobny łańcuch charakteryzuje się jeszcze wyższą aktywnością [13]. W badaniach *in vitro* na liniach komórkowych nerwiaka płodowego (SK-N-SH i LAN-1) oraz raka jajnika SKOV3 syryngolina A wykazuje działanie antyproliferacyjne (IC₅₀ rzędu 20–25 μ M). W komórkach SK-N-SH zaobserwowano zwiększony poziom białka p53 oraz indukcję apoptozy [15]. Glidobaktyna A wykazuje bardzo silne działanie antyproliferacyjne na linie komórkowe szpiczaka mnogiego, zarówno podatne na deksametazon MM1.S, jak i odporne na niego MM1.RL (IC₅₀ odpowiednio 4 i 5 nM), poza tym silnie hamuje aktywność CT-L proteasomu w komórkach SK-N-SH (IC₅₀ = 15 nM). Co istotne, przewyższa pod tymi względami zarówno syryngolinę A, jak i jej dwie syntetyczne pochodne z łańcuchem bocznym. Dokładniejsze badania nad działaniem glidobaktyny A w linii SK-N-SH wykazują akumulację p53 i indukcję apoptozy, aktywację Akt/PKB przez jej fosforylację, a także indukcję autofagii, za czym przemawia obecność autofagosomów oraz lipidowanej postaci białka LC3 [5].

Peptydy cykliczne

TMC-95A jest peptydem cyklicznym wyizolowanym z pożywki hodowlanej *Apiospora montagnei*, jednokomórkowego grzyba należącego do workowców. Związek ten hamuje aktywności CT-L, T-L i C-L przy IC₅₀ odpowiednio 5,4, 200 i 60 nM. Mechanizm działania, wyjaśniony na podstawie badań krystalograficznych, opiera się o tworzenie wiązań wodorowych z podjednostką 20S proteasomu [90].

Argiryna A, peptyd wykazujący właściwości immunosupresyjne, została pozyskana z bakterii śluzowej *Archangium gephyra*. Związek ten najsilniej hamuje aktywność CT-L, słabiej C-L i najsłabiej T-L. W komórkach nowotworowych linii HCT116, SW480 i HeLa argiryna A sprzyja akumulacji białek p27, p53, p21, Bax, lecz także NF- κ B. Dalsze badania ukazują odmienne reakcje komórek różnych linii na dodatek argiryny A: o ile w liniach komórkowych ludzkich pierwotnych fibroblastów, A549 i HCT116 obserwuje się zahamowanie proliferacji i zatrzymanie cyklu w fazie G1, w komórkach SW480, CaCo, MCF7 i HeLa występuje indukcja apoptozy. Argiryna A w modelu ksenograftów linii SW480 u myszy wykazuje skuteczność porównywalną z bortezomibem, ponadto w przeciwieństwie do niego nie powoduje spadku masy ciała zwierząt [64].

Scytonemid A, peptyd zawierający ugrupowanie iminowe, został wyizolowany z podłoża fermentacyjnego sinic *Scytonema hofmannii*. Związek ten hamuje aktywność CT-L proteasomu 20S przy IC₅₀ = 96 nM. Badania na linii komórkowej HT-29 nie dały zadowalających rezultatów, co przypisywano utrudnionemu przenikaniu substancji przez błonę komórkową. Doświadczenie powtórzono, tym razem badając aktywność proteasomu metodami luminescencyjnymi. Wykazano 80% inhibicji już przy stężeniu 6,7 nM, przy którym nie obserwowano cytotoksyczności. Sugeruje to niestabilność chemiczną lub metaboliczną scytonemidu A *in cellulo* przy dłuższej kilkudniowej inkubacji, co można teoretycznie poprawić przez chemiczną modyfikację peptydu [43].

INNE INHIBITORY PROTEASOMU POCHODZENIA NATURALNEGO

Gliotoksyna jest toksyną z grupy epipolitiiodioksopirazyn wyizolowaną pierwotnie z grzyba *Gliocladium fimbriatum*, a wytwarzaną również przez *Aspergillus fumigatus* i wykazującą silne działanie immunosupresyjne. Odnotowano również silne działanie hamujące aktywację NF- κ B w limfocytach TiB [68].

Związek ten hamuje wszystkie trzy podstawowe aktywności proteasomu, przy czym najsilniej CT-L (>60% inhibicji przy 1 μ M dla izolowanych proteasomów) i nie ma znaczącego wpływu na aktywność proteaz. Z badań na komórkach HeLa oraz komórkach mononuklearnych z krwi obwodowej wynika, że obecność gliotoksyny w stężeniu 1 μ M jest wystarczająca, aby zahamować aktywację NF- κ B wywołaną przez stymulację TNF. Jest to związane ze stabilizacją poziomu I κ B α wywołaną przez inhibicję proteasomu. Mechanizm działania gliotoksyny związany jest z obecnością mostka disulfidowego [42]. Gliotoksyna ze względu na szczególnie silną inhibicję proteasomu *Plasmodium falciparum* może znaleźć zastosowanie jako lek przeciwmalaryczny, zwłaszcza w szczepach zarodźca opornych na działanie chlorochiny [33].

Agosterole są polihydroksysterolami obecnymi w gąbkach z rodzaju *Spongia* i *Acanthodendrilla*, z których najsilniejszym inhibitorem aktywności CT-L jest agosterol C (IC₅₀ = 10 μ g/mL) [88]. Warty odnotowania jest silnie hamujący wpływ agosteroli na zjawisko oporności wielolekowej w komórkach raka szyjki macicy linii KB-3-1, KB-C2 i KB-CV60, przy czym dwie ostatnie linie charakteryzują się nadekspresją odpowiednio glikoproteiny P i MRP [3,4]. Gąbki z rodzaju *Mycale* wytwarzają inhibitory proteasomu należące do grupy mikaloidów, z których najwyższą aktywność ma sekomikaloid A (IC₅₀ = 11 μ g/mL) [90]. Z gąbki *Aptos suberitoides* wyizolowano alkaloid aaptaminę i wiele jego pochodnych dobrze hamujących aktywność CT-L (IC₅₀ rzędu kilku μ g/mL), nie zaobserwowano jednak korelacji pomiędzy siłą inhibicji proteasomu a ich dużą cytotoksycznością w komórkach HeLa (demetyloaaptamina wykazuje minimalnie słabszą inhibicję i jest o wiele bardziej cytotoksyczna) [89].

Kurkumina, polifenol o intensywnie żółtym zabarwieniu pochodzący z kłączy ostryżu długiego (*Curcuma longa*), jest znana z działania przeciwutleniającego, przeciwzapalnego oraz przeciwnowotworowego, zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Działanie proapoptotyczne i antyproliferacyjne kurkuminy jest dobrze udokumentowane i związane z wpływem na białka z rodziny Bcl-2, kaspazy, receptory śmierci, cykl komórkowy oraz liczne ścieżki sygnałowe, ponadto dotyczy ono niemal wyłącznie komórek nowotworowych [75]. Kurkumina okazuje się również inhibitorem aktywności proteasomu – w komórkach linii Neuro 2a jej dodatek w stężeniu 10 μM powoduje obniżenie aktywności CT-L, T-L i C-L proteasomu prawie do 60%. Ponadto obserwuje się spadek poziomu wolnej ubikwityny oraz wzrost okresu półtrwania destabilizowanego białka GFP. Indukcja apoptozy przez kurkuminę związana jest ze wzrostem poziomu białka p53 oraz aktywacją kaspazy 9 i 3. W badaniach na komórkach HeLa zaobserwowano natomiast spadek potencjału błony mitochondrialnej oraz wyciek cytochromu c do cytosolu. Podobnie jak inne inhibitory proteasomu, kurkumina wykazuje słabsze działanie antyproliferacyjne na zróżnicowane komórki Neuro 2a oraz stymuluje rozrost neurytów w tej linii [36]. Nowsze doniesienia dotyczą wpływu kurkuminy na komórki raka jelita grubego linii HCT-116 oraz SW480 i wywodzące się z tych linii ksenografty u myszy. Obserwuje się zależny od dawki i czasu wzrost poziomu ubikwitynylation białek, w tym I κ B α , a także wzmożoną aktywność p27, kaspazy 3 i 7, spadek aktywności cykliny D1 oraz zmiany morfologiczne charakterystyczne dla apoptozy. IC₅₀ dla aktywności CT-L, T-L, i C-L izolowanego proteasomu 20S wynosi odpowiednio 1,85, 6,23 i 3,68 μM . Sugeruje się, że karbonylowe atomy węgla kurkuminy są bardzo podatne na nukleofilowy atak grupy hydroksylowej treoniny zawartej w miejscu aktywnym podjednostki $\beta 5$. Cząsteczka kurkuminy związana w ten sposób może też tworzyć wiązania wodorowe z pobliskimi aminokwasami, dodatkowo stabilizujące kompleks [51].

Warto odnotować, że chociaż kurkumina w niższych dawkach jest czynnikiem neuroprotektynym o możliwym zastosowaniu w terapii chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, Parkinsona czy Huntingtona, jej wyższe stężenia przekraczające kilka μM mogą wywierać działanie odwrotne [14]. Wykazano, że inhibicja aktywności proteasomu przez kurkuminę w neuronach wytwarzających zmutowaną postać huntingtyny (odpowiedzialną za rozwój choroby Huntingtona) przyczynia się do ich jeszcze szybszej śmierci i progresji choroby [21]. Niższe stężenia mogą z kolei, na zasadzie hormezy, indukować aktywność proteasomu, co wykazano na przykładzie keratynocytów inkubowanych z kurkuminą w stężeniu 1 μM , gdzie aktywność CT-L wzrosła o 46%. Preinkubacja z kurkuminą w stężeniu 3 μM przez dobę indukowała z kolei wytwarzanie białek szoku cieplnego HSP70 i HSP90, przy czym oba te zjawiska nie występowały w wyższych stężeniach, rzędu 10 μM [1]. Konsekwencje inhibicji proteasomu w komór-

kach nienowotworowych, zwłaszcza nerwowych, mogą być zatem różnorodne i nie zawsze pożądane, a samo działanie niektórych inhibitorów proteasomu może być dwufazowe i przy niższych stężeniach uruchamiać mechanizmy adaptacyjne.

Także kapsaicyna, substancja odpowiedzialna za palący smak ostrych odmian papryki, o dobrze udokumentowanym działaniu proapoptotycznym, okazuje się, że hamująco wpływa na aktywność CT-L i C-L proteasomu (IC₅₀ około 300 μM), a także zwiększa poziom ubikwitynowanych białek. Podobnie jak MG-132, w komórkach linii Neuro 2a kapsaicyna indukuje rozrost neurytów. Komórki tej linii pod wpływem kapsaicyny ostatecznie ulegają apoptozie (IC₅₀ około 600 μM), potwierdzoną przez wzrost poziomu p27, p53 i Bax, spadek Bcl-2, obniżenie potencjału błony mitochondrialnej, uwolnienie cytochromu c oraz aktywację kaspaz. Co ciekawe, wraz ze wzrostem dawki obserwuje się zarówno obniżenie aktywności NF- κ B, jak i spadek poziomu jego inhibitora, I κ B α [50]. Wynika z tego, że indukcja apoptozy przez kapsaicynę jest, przynajmniej częściowo, efektem inhibicji proteasomów.

Aktywność przeciwnowotworowa wielu polifenoli pochodzenia roślinnego również zdaje się silnie powiązana z inhibicją proteasomu. Wykazano szczególną aktywność polifenoli zawierających ugrupowanie estrowe – głównie 3-galusanu epigallokatechiny (EGCG) oraz kwasu taninowego. Związki te hamują najsilniej aktywność CT-L i znacznie słabiej C-L oraz T-L. Sugeruje się, że mechanizm działania estrów polifenoli jest związany z nukleofilowym atakiem grupy hydroksylowej treoniny podjednostki β na karbonylowy atom węgla inhibitora, podobnie jak w przypadku opisanych wcześniej beta-laktonów [61].

EGCG wykazuje silną inhibicję aktywności CT-L izolowanych proteasomów 20S przy IC₅₀ = 86 nM. Epigallokatechina i kwas galusowy wykazują o wiele mniejszy wpływ na aktywność izolowanego proteasomu niż EGCG (IC₅₀ rzędu kilku mM), co podkreśla szczególną rolę ugrupowania estrowego. EGCG hamuje również aktywność proteasomu w licznych liniach komórkowych: LNCaP, PC-3, MCF7 oraz Jurkat (najniższe IC₅₀ = 18 μM). Obserwuje się dodatkowo akumulację p27, I κ B α oraz ubikwitynowanych białek już przy stężeniu 1 μM , przy czym nie zdarza się to przy inkubacji komórek z epigallokatechiną. Akumulacja p27 oraz I κ B α zachodzi ponadto na znacznie większą skalę w transformowanych fibroblastach linii VA-13, niż w ich nienowotworowych odpowiednikach linii WI-38 [61].

Stereoizomeria EGCG nie ma wpływu na inhibicję proteasomu. Zarówno naturalnie występujący izomer (–)-EGCG, jak i syntetyczny (+)-EGCG wykazują zbliżone wartości IC₅₀. GCG (3-galusan gallokatechiny, która jest naturalnym epimerem epigallokatechiny) wykazuje słabsze działanie niż EGCG, jednak i w tym przypadku zarówno (–)-GCG, jak i (+)-GCG wykazują zbliżone

IC50. Oba (+)-stereoizomery wywołują również wzrost poziomu p27 i IκBα, a (+)-EGCG indukuje apoptozę w komórkach LNCaP poprzez akumulację Bax [85]. Dowiedziono, że O-metylacja EGCG osłabia jego aktywność tym bardziej, im więcej grup metylowych zawiera dana pochodna, a całkowicie O-benzylowana postać EGCG jest niezdolna do inhibicji proteasomu, co wskazuje na ważną rolę wolnych grup hydroksylowych i sugeruje prawdopodobny los tego związku w ramach biotransformacji [45,85]. Z tego względu dokonano syntezy całkowicie O-acetylowanej pochodnej EGCG, ulegającej hydrolizie wewnątrz komórki, która wykazuje większą aktywność, prawdopodobnie zarówno dzięki mniejszej podatności na O-metylację, jak i zwiększonej lipofilności [22].

Kwas taninowy silnie i swoiście hamuje aktywność CT-L izolowanych proteasomów 20S (IC50 = 0,06 μg/mL), a także aktywność proteasomu 26S komórek Jurkat. Pod jego wpływem zachodzi akumulacja białek p27 i Bax, obserwuje się także zatrzymanie cyklu w fazie G1 oraz indukcję apoptozy [62]. Należy nadmienić, że także w przypadku kwasu taninowego i EGCG obserwuje się inhibicję aktywności glikoproteiny P w komórkach linii KB-C2, wykazujących jej nadekspresję, przy czym przypisuje się to w dużej mierze bezpośredniej interakcji z tym białkiem transporterowym. Kwas taninowy przewyższa pod tym względem EGCG prawdopodobnie ze względu na większą liczbę ugrupowań galloilowych [40,41]. W naskórku myszy wykazano umiarkowaną zdolność kwasu taninowego do hamowania indukowanej 12-O-tetradekanoilo-13-octanem forbolu (TPA) aktywności proteasomu [11]. W badaniach tych hamowana była głównie aktywność C-L, natomiast aktywności CT-L i T-L były modulowane w mniejszym stopniu.

Do inhibicji proteasomu są również zdolne flawonoidy, takie jak genisteina, kwercetyna, mirycetyna, apigenina oraz kemferol. Genisteina hamuje aktywność CT-L izolowanych proteasomów (IC50 = 26 μM) oraz w komórkach linii MCF7 i LNCaP, zwiększając poziom białek p27, IκBα oraz Bax [38]. Spośród pozostałych flawonoidów największą aktywność wykazują apigenina i kwercetyna, osiągając w izolowanych proteasomach 20S IC50 odpowiednio 1,8 i 3,5 μM. IC50 mirycetyny i kemferolu wynosi odpowiednio 10 i 10,5 μM. Wartości IC50 wyznaczone dla proteasomu w nienaruszonych komórkach linii Jurkat są zbliżone do wyżej wymienionych i wynoszą odpowiednio 1, 2, 12 i 11 μM. Związki te zwiększają poziom IκBα, BAX i kaspazy 3, indukując apoptozę, przy czym ich siła działania koreluje z wartościami IC50. Dodatkowo, apigenina nie hamuje aktywności proteasomu i nie indukuje apoptozy w nienowotworowych limfocytach T. Postuluje się, że podobnie jak w przypadku β-laktonów i estrów kwasu galusowego mechanizm działania związany jest z nukleofilowym atakiem grupy hydroksylowej łańcucha bocznego reszty treoninowej na karbonylowy węgiel C4 flawonoidu. Brak grupy hydroksylowej w pozycji C3 prawdopodobnie ułatwia wpasowanie cząsteczki inhibitora w miejsce aktywnym podjed-

nostki β. Obecność dodatkowych grup hydroksylowych w pierścieniu benzenowym przy C2 wydaje się osłabiać aktywność inhibitora [10].

Za istotne klinicznie należy uważać wzmianki o interakcji EGCG oraz pokrewnych polifenoli z bortezomibem. W liniach komórkowych szpiczaka RPMI/8226 oraz glejaka U251 i LN229 dodatek EGCG osłabia działanie bortezomibu i MG-262, boronianowego analogu MG-132. Podobne działanie obserwuje się *in vivo* w ksenograftach linii RPMI/8226 u myszy. Przypuszcza się, że dochodzi tu do inaktywacji grupy boronianowej przez jej połączenie z grupą 1,2-diolową, obecną w EGCG i innych polifenolach [27]. Podobną atenuację powodują także kwercetyna i mirycetyna w liniach komórkowych chłoniaka i szpiczaka. Z tego względu spożywanie większej ilości polifenoli jest przeciwwskazane u osób poddanych terapii inhibitorami proteasomu z ugrupowaniem boronianowym, choć wykazano również, że w obecności nieorganicznego kwasu borowego bortezomib odzyskuje swoją aktywność, prawdopodobnie ze względu na preferencyjne wiązanie się polifenoli z kwasem borowym [48].

Celastrol, należący do grupy triterpenów, jest jednym z czynnych składników pnącza *Tripterygium wilfordii*, stosowanego w chińskiej medycynie naturalnej jako środek przeciwzapalny. Wykazuje inhibicję aktywności CT-L proteasomu 20S przy IC50 = 2,5 μM. W komórkach raka prostaty linii PC-3 i LNCaP celastrol powoduje wzrost poziomu ubikwitynowanych białek, IκBα, Bax oraz p27, czego następstwem jest indukcja apoptozy. W modelu ksenograftów linii PC-3 wszczepianych myszom, celastrol podawany dootrzewnowo w dawce 1-3 mg/kg m.c./d przez 31 dni powodował znaczny (65-93%) spadek masy guza [100]. Z dalszych badań na liniach komórkowych PC-3, DU145 oraz CL1 wynika dodatkowo, że celastrol jest w stanie zapobiegać migracji i zmniejszać inwazyjność komórek, obniżać konstytutywną aktywność NF-κB, aktywować proapoptotyczne białko Noxa i hamować aktywność antyapoptotyczną białka Mcl-1 [19].

Witaferyna A jest laktonem steroidowym pochodzącym z rośliny *Withania somnifera*, stosowanej w medycynie ajurwedyjskiej jako środek tonizujący. Badania nad farmakologią wyciągu z *W. somnifera* wskazują m.in. na właściwości przeciwzapalne, immunomodulacyjne, kardio- i neuroprotektcyjne oraz przeciwnowotworowe. Działanie przeciwnowotworowe ma związek z inhibicją NF-κB i indukcją apoptozy, co jest następstwem inhibicji proteasomu. IC50 w odniesieniu do aktywności CT-L izolowanego proteasomu 20S wynosi 4,5 μM. W liniach komórkowych raka prostaty (w stężeniu 5-10 μM) oraz wywodzących się z nich ksenograftach (4-8 mg/kg m.c./d) witaferyna A powoduje wzrost poziomu Bax, p27, IκBα oraz ubikwitynowanych białek, co ostatecznie skutkuje apoptozą. Ponadto, w androgenozależnych komórkach linii LNCaP następuje supresja receptorów androgenowych [101].

Tabela 2. Leki modulujące szlak UPS

Klasa leków	Mechanizm działania
Czynniki chemioterapeutyczne	
Aklarubicyna	inhibitor aktywności CT-L proteasomu
All-trans kwas retinowy	może przyspieszać degradację onkoprotein w białaczce przez proteasom
Trójtlenek arsenu	hamuje ubikwitynację i degradację IκB poprzez oddziaływanie na kinazę białka IκB (IKK)
Kamptotecyna	stymuluje ubikwitynację i degradację topoizomerazy 1
Geldanamycyna	hamuje ATP-azę HSP90, stymulując proteasomalną degradację zależnych od niego białek
Winblastyna, winkrystyna	inhibicja aktywności T-L, CT-L i PGPB proteasomu
Związki immunosupresyjne	
Cyklosporyna A	niekompetycyjny inhibitor aktywności chymotrypsynopodobnej proteasomu
Rapamycyna	hamuje funkcje proteasomu poprzez inhibicję aktywatora proteasomu PA28
Inne związki	
Fulwestrant	stymuluje zależną od proteasomu proteolizę ERα (receptor estrogenowy)
Lowastatyna	inhibitor aktywności CT-L, aktywność prawdopodobnie związana z ugrupowaniem δ-laktonowym
Leki przeciwretrowirusowe (np. ritonawir)	inhibitory aktywności CT-L i T-L
Kwas acetylosalicylowy	inhibitor aktywności CT-L

LEKI WPŁYWAJĄCE NA AKTYWNOŚĆ PROTEASOMU

Poza związkami, których głównym mechanizmem działania jest wpływ na szlak UPS istnieje duża grupa leków, wprowadzonych wcześniej do praktyki klinicznej ze względu na inne właściwości, które jak się okazuje również wykazują znaczny wpływ na aktywność tej ścieżki proteolitycznej. Leki te zostały wymienione w tabeli 2.

PODSUMOWANIE

Inhibitory proteasomu są nową i unikalną klasą związków, które wykazują mechanizm działania znacznie odbiegający od konwencjonalnych czynników chemioterapeutycznych. Poza tym inhibitory te wykazują zdolność silniejszego oddziaływania na komórki transformowane niż na zdrowe, zwiększają wrażliwość komórek nowotworowych na chemioterapeutyki i pokonują oporność wielolekową. Są to cechy idealnych kandydatów do stosowania w skojarzonej terapii przeciwnowotworowej – zarówno w połączeniu z konwencjonalnymi chemioterapeutykami, jak i z inhibitorami proteasomu należącymi do innych grup.

O ile proteasom 20S jest główną strukturą systemu UPS, nie jest jedynym jego elementem, którego aktywność można zahamować. Pojawia się coraz więcej doniesień na temat możliwości hamowania enzymów E1, E2 i E3, a więc czynników zapewniających aktywność ubikwityny, rozpoznanie substratu i jego sprawną ubikwitynylację. Szczególne nadzieje wiąże się z selektywną inhibicją enzymów klasy E3, które są odpowiedzialne za rozpoznanie specyficznego substratu przeznaczanego do degradacji, konieczne są jednak dalsze badania dotyczące motywów strukturalnych biorących udział w swoistym wiązaniu danego substratu. Ponieważ przed degradacją białka przyłączony do niego łańcuch poliubikwityny musi zostać uchwycony i odłączony, istnieje także możliwość hamowania enzymów deubikwitynylujących oraz podjednostek regulatorowych proteasomu.

Zarówno z punktu widzenia metodologii badań nad inhibicją proteasomu, jak i praktycznego zastosowania samych inhibitorów warto zauważyć, że IC50 w porównaniu do izolowanych proteasomów jest przeważ-

nie zawsze niższe od IC50 w odniesieniu do inhibicji proteasomów w żywych, nietkniętych komórkach. O ile pierwsza wartość determinuje aktywność danego związku, druga decyduje o jego potencjalnym zastosowaniu w terapii. W zależności od typu inhibitora różnice między tymi dwiema wartościami mogą wahać się od nieznacznych, jak w przypadku flawonoidów [10], do nawet kilkusetkrotnych w przypadku niektórych peptydów [2]. Ma to z pewnością związek z utrudnioną przenikalnością przez błonę komórkową, co zdaje się potwierdzać lepsza skuteczność lipofilowych pochodnych wielu inhibitorów. Nie można jednak wykluczyć innych przyczyn, np. niestabilność chemiczna niektórych inhibitorów w złożonym środowisku wewnątrzkomórkowym.

Ze względu na liczne doniesienia o skutkach inhibicji proteasomu w komórkach nerwowych, istotnym efektem ubocznym stosowania inhibitorów proteasomu może być sprzyjanie rozwojowi chorób neurodegeneracyjnych i indukcja apoptozy neuronów, pod warunkiem jednak, że dany inhibitor będzie w stanie przekroczyć barierę krew-mózg. Może to dodatkowo wykluczać możliwość stosowania tych związków w nowotworach układu nerwowego, konieczne są jednak dalsze badania dotyczące wpływu inhibitorów proteasomu na układ nerwowy człowieka, przy czym istotną zmienną może w tym przypadku być zarówno stężenie osiągnięte w neuronie, jak i czas ekspozycji.

Obecność inhibitorów proteasomu pochodzenia naturalnego w diecie człowieka, takich jak kurkumina, kapsaicyna, flawonoidy i estry kwasu galusowego, stwarza realną możliwość zastosowania ich w chemioprewencji nowotworów. Istnienie mechanizmów adaptacyjnych indukowanych przez inhibicję proteasomu oraz trudność w osiągnięciu funkcjonalnych stężeń przy podaniu doustnym może jednak stanowić istotny problem. W tym kontekście na dokładniejsze zbadanie zasługuje wpływ wymienionych substancji w stężeniach osiąganych przy podaniu doustnym na całokształt procesu kancerogenezy w możliwie wielu modelach.

Pomimo względnie słabej aktywności (IC50 rzędu kilkunastu μM i wyższe) licznych inhibitorów proteasomu pochodzenia naturalnego, doniesienia o ich aktywności należy uważać za cenne, poszerzają one bowiem wiedzę na temat interakcji proteasomu z substancjami o określonej budowie chemicznej i mogą się przyczynić do opracowania nowych struktur o aktywności daleko większej niż związki macierzyste. Kolejne, pojawiające się wciąż doniesienia dotyczące inhibicji proteasomów przez substancje o różnorodnej budowie chemicznej skutkują nie tylko możliwością ich zastosowania w terapii przeciwnowotworowej, ale także poszerzeniem ogólnej wiedzy o działaniu systemu UPS i powiązaniu jego aktywności oraz jej inhibicji z innymi ważnymi procesami biochemicznymi, które mogą mieć znaczenie w patogenezie nowotworów i innych schorzeń degeneracyjnych.

PIŚMIENICTWO

- [1] Ali R.E., Rattan S.I.: Curcumin's biphasic hormetic response on proteasome activity and heat-shock protein synthesis in human keratinocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2006; 1067: 394-399
- [2] An B., Goldfarb R.H., Siman R., Dou Q.P.: Novel dipeptidyl proteasome inhibitors overcome Bcl-2 protective function and selectively accumulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 and induce apoptosis in transformed, but not normal, human fibroblasts. *Cell Death Differ.*, 1998; 5: 1062-1075
- [3] Aoki S., Setiawan A., Yoshioka Y., Higuchi K., Fudetani R., Chen Z.S., Sumizawa T., Akiyama S., Kobayashi M.: Reversal of multidrug resistance in human carcinoma cell line by agosterols, marine sponge sterols. *Tetrahedron*, 1999; 55: 13965-13972
- [4] Aoki S., Yoshioka Y., Miyamoto Y., Higuchi K., Setiawan A., Murakami N., Chen Z.S., Sumizawa T., Akiyama S., Kobayashi M.: Agosterol A, a novel polyhydroxylated sterol acetate reversing multidrug resistance from a marine sponge of *Spongia* sp. *Tetrahedron Lett.*, 1998; 39: 6303-6306
- [5] Archer C.R., Koomoa D.L., Mitsunaga E.M., Clerc J., Shimizu M., Kaiser M., Schellenberg B., Dudler R., Bachmann A.S.: Syrbactin class proteasome inhibitor-induced apoptosis and autophagy occurs in association with p53 accumulation and Akt/PKB activation in neuroblastoma. *Biochem. Pharmacol.*, 2010; 80: 170-178
- [6] Arlt A., Bauer I., Schafmayer C., Tepel J., Mürköster S.S., Brosch M., Röder C., Kalthoff H., Hampe J., Moyer M.P., Fölsch U.R., Schäfer H.: Increased proteasome subunit protein expression and proteasome activity in colon cancer relate to an enhanced activation of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2). *Oncogene*, 2009; 28: 3983-3996
- [7] Asai A., Hasegawa A., Ochiai K., Yamashita Y., Mizukami T.: Belactosin A, a novel antitumor antibiotic acting on cyclin/CDK mediated cell cycle regulation, produced by *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.*, 2000; 53: 81-83
- [8] Asai A., Tsujita T., Sharma S.V., Yamashita Y., Akinaga S., Funakoshi M., Kobayashi H., Mizukami T.: A new structural class of proteasome inhibitors identified by microbial screening using yeast-based assay. *Biochem. Pharmacol.*, 2004; 67: 227-234
- [9] Chauhan D., Singh A.V., Aujay M., Kirk C.J., Bandi M., Ciccarelli B., Raje N., Richardson P., Anderson K.C.: A novel orally active proteasome inhibitor ONX 0912 triggers in vitro and in vivo cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood*, 2010; 116: 4906-4915
- [10] Chen D., Daniel K.G., Chen M.S., Kuhn D.J., Landis-Piwovar K.R., Dou Q.P.: Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. *Biochem. Pharmacol.*, 2005; 69: 1421-1432
- [11] Cichocki M., Blumczyńska J., Baer-Dubowska W.: Naturally occurring phenolic acids inhibit 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced NF-kappaB, iNOS and COX-2 activation in mouse epidermis. *Toxicology*, 2010; 268: 118-124
- [12] Ciechanover A.: The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*, 1994; 79: 13-21
- [13] Clerc J., Groll M., Illich D.J., Bachmann A.S., Huber R., Schellenberg B., Dudler R., Kaiser M.: Synthetic and structural studies on syringolin A and B reveal critical determinants of selectivity and potency of proteasome inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009; 106: 6507-6512

- [14] Cole G.M., Teter B., Frautschy S.A.: Neuroprotective effects of curcumin. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2007; 595: 197-212
- [15] Coleman C.S., Rocetes J.P., Park D.J., Wallick C.J., Warn-Cramer B.J., Michel K., Dudler R., Bachmann A.S.: Syringolin A, a new plant elicitor from the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, inhibits the proliferation of neuroblastoma and ovarian cancer cells and induces apoptosis. *Cell Prolif.*, 2006; 39: 599-609
- [16] Craiu A., Gaczynska M., Akopian T., Gramm C.F., Fenteany G., Goldberg A.L., Rock K.L.: Lactacystin and clasto-lactacystin β -lactone modify multiple proteasome β -subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 13437-13445
- [17] Crawford L.J., Walker B., Irvine A.E.: Proteasome inhibitors in cancer therapy. *J. Cell Commun. Signal.*, 2011; 5: 101-110
- [18] Cusack J.C.Jr., Liu R., Houston M., Abendroth K., Elliott P.J., Adams J., Baldwin A.S.Jr.: Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: implications for systemic nuclear factor- κ B inhibition. *Cancer Res.*, 2001; 61: 3535-3540
- [19] Dai Y., Desano J., Tang W., Meng X., Meng Y., Burstein E., Lawrence T.S., Xu L.: Natural proteasome inhibitor celastrol suppresses androgen-independent prostate cancer progression by modulating apoptotic proteins and NF- κ B. *PLoS One*, 2010; 5: e14153
- [20] DeMartino G.N., Slaughter C.A.: The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 22123-22126
- [21] Dikshit P., Goswami A., Mishra A., Nukina N., Jana N.R.: Curcumin enhances the polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin-induced cell death by promoting proteasomal malfunction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006; 342: 1323-1328
- [22] Dou Q.P., Landis-Piwowar K.R., Chen D., Huo C., Wan S.B., Chan T.H.: Green tea polyphenols as a natural tumour cell proteasome inhibitor. *Inflammopharmacology*, 2008; 16: 208-212
- [23] Fenteany G., Schreiber S.L.: Lactacystin, proteasome function, and cell fate. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 8545-8548
- [24] Fenteany G., Standaert R.F., Reichard G.A., Corey E.J., Schreiber S.L.: A β -lactone related to lactacystin induces neurite outgrowth in a neuroblastoma cell line and inhibits cell cycle progression in an osteosarcoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994; 91: 3358-3362
- [25] Fujita T., Washio K., Takabatake D., Takahashi H., Yoshitomi S., Tsukuda K., Ishibe Y., Ogasawara Y., Doihara H., Shimizu N.: Proteasome inhibitors can alter the signaling pathways and attenuate the P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Int. J. Cancer*, 2005; 117: 670-682
- [26] Glickman M.H., Ciechanover A.: The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.*, 2002; 82: 373-428
- [27] Golden E.B., Lam P.Y., Kardosh A., Gaffney K.J., Cadenas E., Louie S.G., Petasis N.A., Chen T.C., Schönthal A.H.: Green tea polyphenols block the anticancer effects of bortezomib and other boronic acid-based proteasome inhibitors. *Blood*, 2009; 113: 5927-5937
- [28] Groll M., Kim K.B., Kairies N., Huber R., Crews C.M.: Crystal structure of epoxomicin: 20S proteasome reveals a molecular basis for selectivity of α' , β' -epoxyketone proteasome inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000; 122: 1237-1238
- [29] Grzelakowska-Sztartabert B.: Zależna od ubikwiny degradacja białek. Nagroda Nobla z chemii w 2004 roku. *Kosmos – Problemy Nauk Biologicznych*, 2005; 54: 133-148
- [30] Gulder T.A., Moore B.S.: Salinosporamide natural products: potent 20S proteasome inhibitors as promising cancer chemotherapeutics. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2010; 49: 9346-9367
- [31] Hanada M., Sugawara K., Kaneta K., Toda S., Nishiyama Y., Tomita K., Yamamoto H., Konishi M., Oki T.: Epoxomicin, a new antitumor agent of microbial origin. *J. Antibiot.*, 1992; 45: 1746-1752
- [32] Hanahan D., Weinberg R.A.: The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000; 100: 57-70
- [33] Hatabu T., Hagiwara M., Taguchi N., Kiyozawa M., Suzuki M., Kano S., Sato K.: Plasmodium falciparum: The fungal metabolite gliotoxin inhibits proteasome proteolytic activity and exerts a plasmodicidal effect on P. falciparum. *Exp. Parasitol.*, 2006; 112: 179-183
- [34] Irish J.M., Kotecha N., Nolan G.P.: Mapping normal and cancer cell signalling networks: towards single-cell proteomics. *Nat. Rev. Cancer*, 2006; 6: 146-155
- [35] Jackson G., Einsele H., Moreau P., Miguel J.S.: Bortezomib, a novel proteasome inhibitor, in the treatment of hematologic malignancies. *Cancer Treat. Rev.*, 2005; 31: 591-602
- [36] Jana N.R., Dikshit P., Goswami A., Nukina N.: Inhibition of proteasomal function by curcumin induces apoptosis through mitochondrial pathway. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 11680-11685
- [37] Kane R.C., Farrell A.T., Sridhara R., Pazdur R.: United States Food and Drug Administration approval summary: bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy. *Clin. Cancer Res.*, 2006; 12: 2955-2960
- [38] Kazi A., Daniel K.G., Smith D.M., Kumar N.B., Dou Q.P.: Inhibition of the proteasome activity, a novel mechanism associated with the tumor cell apoptosis-inducing ability of genistein. *Biochem. Pharmacol.*, 2003; 66: 965-976
- [39] Kisselev A.F., Callard A., Goldberg A.L.: Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 8582-8590
- [40] Kitagawa S., Nabekura T., Kamiyama S.: Inhibition of P-glycoprotein function by tea catechins in KB-C2 cells. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2004; 56: 1001-1005
- [41] Kitagawa S., Nabekura T., Nakamura Y., Takahashi T., Kashiwada Y.: Inhibition of P-glycoprotein function by tannic acid and pentagalloylglucose. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2007; 59: 965-969
- [42] Kroll M., Arenzana-Seisdedos F., Bachelier F., Thomas D., Friguet B., Conconi M.: The secondary fungal metabolite gliotoxin targets proteolytic activities of the proteasome. *Chem. Biol.*, 1999; 6: 689-698
- [43] Kronic A., Vallat A., Mo S., Lantvit D.D., Swanson S.M., Orjala J.: Scytonemides A and B, cyclic peptides with 20S proteasome inhibitory activity from the cultured cyanobacterium *Scytonema hofmannii*. *J. Nat. Prod.*, 2010; 73: 1927-1932
- [44] Kuhn D.J., Chen Q., Voorhees P.M., Strader J.S., Shenk K.D., Sun C.M., Demo S.D., Bennett M.K., van Leeuwen F.W., Chanan-Khan A.A., Orlowski R.Z.: Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *Blood*, 2007; 110: 3281-3290
- [45] Landis-Piwowar K.R., Wan S.B., Wiegand R.A., Kuhn D.J., Chan T.H., Dou Q.P.: Methylation suppresses the proteasome-inhibitory function of green tea polyphenols. *J. Cell. Physiol.*, 2007; 213: 252-260
- [46] Li W., Zhang X., Olumi A.F.: MG-132 sensitizes TRAIL-resistant prostate cancer cells by activating c-Fos/c-Jun heterodimers and repressing c-FLIP(L). *Cancer Res.*, 2007; 67: 2247-2255
- [47] Lin G., Li D., Chidawanyika T., Nathan C., Li H.: Fellutamide B is a potent inhibitor of the *Mycobacterium tuberculosis* proteasome. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2010; 501: 214-220

- [48] Liu F.T., Agrawal S.G., Movasaghi Z., Wyatt P.B., Rehman I.U., Gribben J.G., Newland A.C., Jia L.: Dietary flavonoids inhibit the anticancer effects of the proteasome inhibitor bortezomib. *Blood*, 2008; 112: 3835-3846
- [49] Löw P.: The role of ubiquitin-proteasome system in ageing. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 2011; 172: 39-43
- [50] Maity R., Sharma J., Jana N.R.: Capsaicin induces apoptosis through ubiquitin-proteasome system dysfunction. *J. Cell. Biochem.*, 2010; 109: 933-942
- [51] Milacic V., Banerjee S., Landis-Piwowar K.R., Sarkar F.H., Majumdar A.P., Dou Q.P.: Curcumin inhibits the proteasome activity in human colon cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.*, 2008; 68: 7283-7292
- [52] Mitsiades C.S., McMillin D., Kotoula V., Poulaki V., McMullan C., Negri J., Fanourakis G., Tseleni-Balafouta S., Ain K.B., Mitsiades N.: Antitumor effect of the proteasome inhibitor bortezomib in medullary and anaplastic thyroid carcinoma cells in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2006; 91: 4013-4021
- [53] Mitsiades N., Mitsiades C.S., Poulaki V., Chauhan D., Fanourakis G., Gu X., Bailey C., Joseph M., Libermann T.A., Treon S.P., Munshi N.C., Richardson P.G., Hideshima T., Anderson K.C.: Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 14374-14379
- [54] Mitsiades N., Mitsiades C.S., Richardson P.G., Poulaki V., Tai Y.T., Chauhan D., Fanourakis G., Gu X., Bailey C., Joseph M., Libermann T.A., Schlossman R., Munshi N.C., Hideshima T., Anderson K.C.: The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. *Blood*, 2003; 101: 2377-2380
- [55] Molineaux S.M.: Molecular pathways: targeting proteasomal protein degradation in cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2012; 18: 15-20
- [56] Momose I., Sekizawa R., Hashizume H., Kinoshita N., Homma Y., Hamada M., Iinuma H., Takeuchi T.: Tyropeptins A and B, new proteasome inhibitors produced by *Kitasatospora* sp. MK993-dF2. I. Taxonomy, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J. Antibiot.*, 2001; 54: 997-1003
- [57] Momose I., Umezawa Y., Hirosawa S., Iinuma H., Ikeda D.: Structure-based design of derivatives of tyropeptin A as the potent and selective inhibitors of mammalian 20S proteasome. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005; 15: 1867-1871
- [58] Murata S., Takahama Y., Tanaka K.: Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides. *Curr. Opin. Immunol.*, 2008; 20: 192-196
- [59] Myung J., Kim K.B., Crews C.M.: The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Med. Res. Rev.*, 2001; 21: 245-273
- [60] Nakamura H., Watanabe M., Ban H.S., Nabeyama W., Asai A.: Synthesis and biological evaluation of boron peptide analogues of Belactosin C as proteasome inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009; 19: 3220-3224
- [61] Nam S., Smith D.M., Dou Q.P.: Ester bond-containing tea polyphenols potently inhibit proteasome activity in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 13322-13330
- [62] Nam S., Smith D.M., Dou Q.P.: Tannic acid potently inhibits tumor cell proteasome activity, increases p27 and Bax expression, and induces G1 arrest and apoptosis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2001; 10: 1083-1088
- [63] Navon A., Ciechanover A.: The 26 S proteasome: from basic mechanisms to drug targeting. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 33713-33718
- [64] Nickeleit I., Zender S., Sasse F., Geffers R., Brandes G., Sörensen I., Steinmetz H., Kubicka S., Carlomagno T., Menche D., Gütgemann I., Buer J., Gossler A., Manns M.P., Kalesse M., Frank R., Malek N.P.: Argyrin A reveals a critical role for the tumor suppressor protein p27kip1 in mediating antitumor activities in response to proteasome inhibition. *Cancer Cell*, 2008; 14: 23-35
- [65] Nitta T., Murata S., Sasaki K., Fujii H., Ripen A.M., Ishimaru N., Koyasu S., Tanaka K., Takahama Y.: Thymoproteasome shapes immunocompetent repertoire of CD8+ T cells. *Immunity*, 2010; 32: 29-40
- [66] O'Connor O.A., Stewart A.K., Vallone M., Molineaux C.J., Kunkel L.A., Gerecitano J.F., Orlowski R.Z.: A phase 1 dose escalation study of the safety and pharmacokinetics of the novel proteasome inhibitor carfilzomib (PR-171) in patients with hematologic malignancies. *Clin. Cancer Res.*, 2009; 15: 7085-7091
- [67] Orlowski R.Z.: The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis. *Cell Death Differ.*, 1999; 6: 303-313
- [68] Pahl H.L., Krauss B., Schulze-Osthoff K., Decker T., Traenckner E.B., Vogt M., Myers C., Parks T., Warring P., Muhlbacher A., Czernilofsky A.P., Bauerle P.A.: The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF- κ B. *J. Exp. Med.*, 1996; 183: 1829-1840
- [69] Panischeva L.A., Kakpakova E.S., Rybalkina E.Y., Stavrovskaya A.A.: Influence of proteasome inhibitor bortezomib on the expression of multidrug resistance genes and Akt kinase activity. *Biochemistry*, 2011; 76: 1009-1016
- [70] Parlati F., Lee S.J., Aujay M., Suzuki E., Levitsky K., Lorens J.B., Micklem D.R., Ruurs P., Sylvain C., Lu Y., Shenk K.D., Bennett M.K.: Carfilzomib can induce tumor cell death through selective inhibition of the chymotrypsin-like activity of the proteasome. *Blood*, 2009; 114: 3439-3447
- [71] Pasquini L.A., Besio Moreno M., Adamo A.M., Pasquini J.M., Soto E.F.: Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, induces apoptosis and activates caspase-3 in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res.*, 2000; 59: 601-611
- [72] Piva R., Ruggeri B., Williams M., Costa G., Tamagno I., Ferrero D., Giai V., Coscia M., Peola S., Massaia M., Pezzoni G., Allievi C., Pescalli N., Cassin M., Giovine S., Nicoli P., Feudis P., Strepponi I., Roato I., Ferracini R., Bussolati B., Camussi G., Jones-Bolin S., Hunter K., Zhao H., Neri A., Palumbo A., Berkers C., Ovaia H., Bernareggi A., Inghirami G.: CEP-18770: A novel, orally active proteasome inhibitor with a tumor-selective pharmacologic profile competitive with bortezomib. *Blood*, 2008; 111: 2765-2775
- [73] Poulaki V., Mitsiades C.S., Kotoula V., Negri J., McMillin D., Miller J.W., Mitsiades N.: The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in human retinoblastoma cells lines in vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2007; 48: 4706-4719
- [74] Ravi R., Bedi A.: NF- κ B in cancer - a friend turned foe. *Drug Resist. Updat.*, 2004; 7: 53-67
- [75] Ravindran J., Prasad S., Aggarwal B.B.: Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively? *AAPS J.*, 2009; 11: 495-510
- [76] Rechsteiner M., Realini C., Ustrell V.: The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation. *Biochem. J.*, 2000; 345: 1-15
- [77] Richardson P.G., Mitsiades C.: Bortezomib: proteasome inhibition as an effective anticancer therapy. *Future Oncol.*, 2005; 1: 161-171
- [78] Richardson P.G., Mitsiades C., Hideshima T., Anderson K.C.: Proteasome inhibition in the treatment of cancer. *Cell Cycle*, 2005; 4: 290-296
- [79] Rock K.L., Gramm C., Rothstein L., Clark K., Stein R., Dick L., Hwang D., Goldberg A.L.: Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*, 1994; 78: 761-771

- [80] Ruschak A.M., Slassi M., Kay L.E., Schimmer A.D.: Novel proteasome inhibitors to overcome bortezomib resistance. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2011; 103: 1007-1017
- [81] Sanchez E., Li M., Steinberg J.A., Wang C., Shen J., Bonavida B., Li Z.W., Chen H., Berenson J.R.: The proteasome inhibitor CEP-18770 enhances the anti-myeloma activity of bortezomib and melphalan. *Br. J. Haematol.*, 2010; 148: 569-581
- [82] Sayers T.J., Murphy W.J.: Combining proteasome inhibition with TNF-related apoptosis-inducing ligand (Apo2L/TRAIL) for cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2006; 55: 76-84
- [83] Shah S.A., Potter M.W., McDade T.P., Ricciardi R., Perugini R.A., Elliott P.J., Adams J., Callery M.P.: 26S proteasome inhibition induces apoptosis and limits growth of human pancreatic cancer. *J. Cell. Biochem.*, 2001; 82: 110-122
- [84] Sliva D.: Signaling pathways responsible for cancer cell invasion as targets for cancer therapy. *Curr. Cancer Drug Targets*, 2004; 4: 327-336
- [85] Smith D.M., Wang Z., Kazi A., Li L.H., Chan T.H., Dou Q.P.: Synthetic analogs of green tea polyphenols as proteasome inhibitors. *Mol. Med.*, 2002; 8: 382-392
- [86] Sorokin A.V., Kim E.R., Ovchinnikov L.P.: Proteasome system of protein degradation and processing. *Biochemistry*, 2009; 74: 1411-1442
- [87] Sun F., Anantharam V., Zhang D., Latchoumycandane C., Kanthasamy A., Kanthasamy A.G.: Proteasome inhibitor MG-132 induces dopaminergic degeneration in cell culture and animal models. *Neurotoxicology*, 2006; 27: 807-815
- [88] Tsukamoto S., Tatsuno M., van Soest R.W., Yokosawa H., Ohta T.: New polyhydroxy sterols: proteasome inhibitors from a marine sponge *Acanthodendrilla* sp. *J. Nat. Prod.*, 2003; 66: 1181-1185
- [89] Tsukamoto S., Yamanokuchi R., Yoshitomi M., Sato K., Ikeda T., Rotinsulu H., Mangindaan R.E., de Voogd N.J., van Soest R.W., Yokosawa H.: Aaptamine, an alkaloid from the sponge *Aaptos suberitoides*, functions as a proteasome inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010; 20: 3341-3343
- [90] Tsukamoto S., Yokosawa H.: Inhibition of the ubiquitin-proteasome system by natural products for cancer therapy. *Planta Med.*, 2010; 76: 1064-1074
- [91] Voorhees P.M., Dees E.C., O'Neil B., Orłowski R.Z.: The proteasome as a target for cancer therapy. *Clin. Cancer Res.*, 2003; 9: 6316-6325
- [92] Wang R.E.: Targeting heat shock proteins 70/90 and proteasome for cancer therapy. *Curr. Med. Chem.*, 2011; 18: 4250-4264
- [93] Watanabe T., Abe H., Momose I., Takahashi Y., Ikeda D., Akamatsu Y.: Structure-activity relationship of boronic acid derivatives of tyropeptin: proteasome inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010; 20: 5839-5842
- [94] Wolf D.H., Hilt W.: The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004; 1695: 19-31
- [95] Wu W.K., Cho C.H., Lee C.W., Wu K., Fan D., Yu J., Sung J.J.: Proteasome inhibition: a new therapeutic strategy to cancer treatment. *Cancer Lett.*, 2010; 293: 15-22
- [96] Wu W.K., Sakamoto K.M., Milani M., Aldana-Masangkay G., Fan D., Wu K., Lee C.W., Cho C.H., Yu J., Sung J.J.: Macroautophagy modulates cellular response to proteasome inhibitors in cancer therapy. *Drug Resist. Updat.*, 2010; 13: 87-92
- [97] Wu W.K., Sung J.J., Wu Y.C., Li Z.J., Yu L., Cho C.H.: Bone morphogenetic protein signalling is required for the anti-mitogenic effect of the proteasome inhibitor MG-132 on colon cancer cells. *Br. J. Pharmacol.*, 2008; 154: 632-638
- [98] Wu W.K., Sung J.J., Yu L., Cho C.H.: Proteasome inhibitor MG-132 lowers gastric adenocarcinoma TMK1 cell proliferation via bone morphogenetic protein signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008; 371: 209-214
- [99] Xie Y.: Structure, assembly and homeostatic regulation of 26S proteasome. *J. Mol. Cell Biol.*, 2010; 2: 308-317
- [100] Yang H., Chen D., Cui Q.C., Yuan X., Dou Q.P.: Celastrol, a triterpene extracted from the Chinese „Thunder of God Vine”, is a potent proteasome inhibitor and suppresses human prostate cancer growth in nude mice. *Cancer Res.*, 2006; 66: 4758-4765
- [101] Yang H., Shi G., Dou Q.P.: The tumor proteasome is a primary target for the natural anticancer compound Withaferin A isolated from „Indian winter cherry”. *Mol. Pharmacol.*, 2007; 71: 426-437
- [102] Yew E.H., Cheung N.S., Choy M.S., Qi R.Z., Lee A.Y., Peng Z.F., Melendez A.J., Manikandan J., Koay E.S., Chiu L.L., Ng W.L., Whiteman M., Kandiah J., Halliwell B.: Proteasome inhibition by lactacystin in primary neuronal cells induces both potentially neuroprotective and pro-apoptotic transcriptional responses: a microarray analysis. *J. Neurochem.*, 2005; 94: 943-956
- [103] Zhang H.G., Wang J., Yang X., Hsu H.C., Mountz J.D.: Regulation of apoptosis proteins in cancer cells by ubiquitin. *Oncogene*, 2004; 23: 2009-2015
- [104] Zhang Y., Shi Y., Li X., Du R., Luo G., Xia L., Du W., Chen B., Zhai H., Wu K., Fan D.: Proteasome inhibitor MG132 reverses multidrug resistance of gastric cancer through enhancing apoptosis and inhibiting P-gp. *Cancer Biol. Ther.*, 2008; 7: 540-546

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.