

STRESZCZENIE

Cytokininy stanowią jedną z grup hormonów roślinnych, które odgrywają ważną rolę we wzroście i rozwoju roślin. Wykazują różne efekty działania, szczególnie stymulują syntezę białek i uczestniczą w kontroli cyklu komórkowego. Pierwszą odkrytą cytokininą była N⁶-furfuryloadenina (kinetyna). Jest ona uważana za silny inhibitor procesów utleniania białek i kwasów nukleinowych w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. Zarówno kinetyna, jak i jej rybozyd (N⁶-furfuryloadenozyna, rybozyd kinetyny) jako naturalne związki występują w mleku kokosowym w stężeniu nanomolarnym. Rybozyd kinetyny selektywnie hamuje proliferację komórek nowotworowych oraz indukuje ich apoptozę. W tym artykule skupiono się na występowaniu rybozydu kinetyny, a przede wszystkim na jego metabolizmie oraz aktywności biologicznej.

WPROWADZENIE

Choroby nowotworowe są w Polsce i na świecie wraz z chorobami układu krążenia główną przyczyną przedwczesnych zgonów. Według danych epidemiologicznych z 2010 roku Polskiej Unii Onkologii i Centrum Onkologii w Warszawie prognozuje się odpowiednio wzrost zachorowań z 130 tys. do 160 tys. oraz wzrost śmiertelności z 85 tys. do 100 tys. rocznie [1]. Dane te obrazują skalę problemu i wskazują na konieczność poszukiwania nowych terapeutyków. Aktualne zainteresowania koncentrują się wokół nowych analogów obecnie stosowanych leków przeciwnowotworowych, małych związków chemicznych pochodzenia naturalnego oraz cząsteczek działających selektywnie na komórki nowotworowe i nie wpływających na komórki prawidłowe organizmu [2]. Wśród cząsteczek o wysokiej aktywności biologicznej i znacznym potencjale terapeutycznym znajdują się hormony roślinne (cytokininy), które są pochodnymi adeniny modyfikowanymi w pozycji N⁶ podstawnikami izoprenoidowymi bądź aromatycznymi.

Rolą cytokinin u roślin jest regulowanie wzrostu i różnicowania komórek oraz indukowanie apoptozy [3]. Prowadzone badania mają na celu określenie ich aktywności w komórkach zwierzęcych oraz wykorzystania ich w ograniczeniu zaburzeń proliferacji i różnicowania komórek.

AKTYWNOŚĆ FARMAKOLOGICZNA ANALOGÓW NUKLEOZYDÓW

Modyfikowane nukleozydy purynowe i pirymidynowe stanowią bardzo różnorodną grupę związków terapeutycznych i są stosowane w leczeniu chorób nowotworowych oraz zakażeń wirusowych. Działają cytotoksycznie na komórki dzielące się oraz pozostające w fazie G₀/G₁ cyklu komórkowego, który składa się z interfazy (okres między podziałami) oraz właściwego podziału - mitozy. W interfazie wyróżnia się fazy G₁, S oraz G₂, a jej celem jest podwojenie materiału genetycznego niezbędnego dla prawidłowego przebiegu mitozy. W pierwszym etapie G₁ następuje wejście komórki w następny cykl replikacyjny i rozpoczęcie biosyntezy białek. W fazie S dochodzi do powielenia materiału genetycznego komórki i formowania chromosomów. W kolejnym etapie, G₂ następuje dalszy wzrost i synteza dodatkowych składników niezbędnych w mitozie, a także naprawa uszkodzeń DNA. Po zakończonym cyklu komórka może ponownie wejść w fazę G₁ i dokonać następnego podziału lub w G₀, która jest stanem zawieszenia aktywności podziałowej. Schematyczny przebieg cyklu komórkowego obrazuje rycina 1. Komórki w fazie syntezy DNA (S) i podziału (M) są podatne na działanie chemoterapeutyków, natomiast w stanie spoczynkowym (G₀, G₁ i G₂), wykazują oporność na aktywność wielu cytostatyków [4,5].

W komórkach proliferujących cytotoksyczność modyfikowanych nukleozydów obejmuje zahamowanie syntezy deoksyrybonukleotydów, inhibicję polimeraz DNA oraz indukowanie apoptozy na drodze zewnątrzkomórkowej, a także mitochondrialnej. Punktami uchwytu są m. in. specyficzne grupy enzymów wirusowych

mgr Dariusz Wawrzyniak¹,
dr hab. Katarzyna Rolle^{1, 2, ✉},
prof. dr hab. Jan
Barciszewski^{1, 3, ✉}

¹Zakład Neuroonkologii Molekularnej, Instytut Chemii Bioorganicznej, Polskiej Akademii Nauk, Poznań

²Centrum Zaawansowanych Technologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

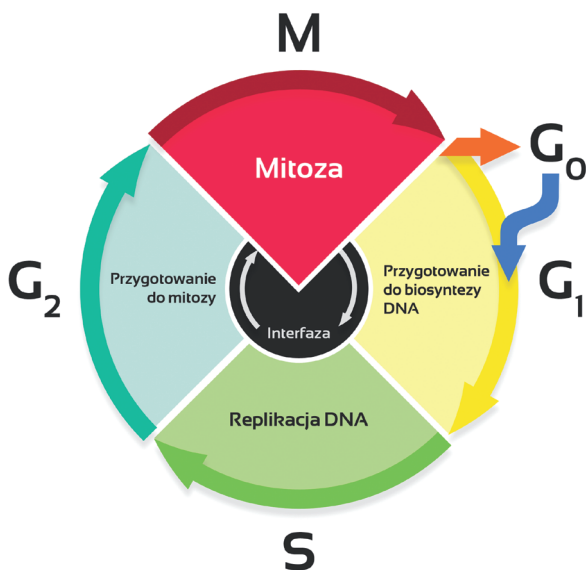
³Centrum NanoBioMedyczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

✉ autorzy korespondujący: kbug@ibch.poznan.pl (KR); Jan.Barciszewski@ibch.poznan.pl (JB)

https://doi.org/10.18388/pb.2019_265

Słowa kluczowe: cytokininy, rybozyd kinetyny, kinaza adenozy, nowotwory, stres oksydacyjny, szlaki sygnałowe

Wykaz skrótów: 8-oxo-dG – 8-oksyo-2'-deoksyguanozyna; ADA – deaminaza adenozy; AdK – kinaza adenozy; Ado – adenozy; BA – N⁶-benzyloadenina; BAR – N⁶-benzyloadenozyna; CDK – kinazy cyklinozależne; CKI – inhibitory kinaz cyklinozależnych; IC₅₀ – stężenie hamujące, dla którego wzrost i proliferacja komórek w hodowli zostają zahamowane w 50%; iP – N⁶-izopentenyloadenina; iPR – N⁶-izopentenyloadenozyna; K – kinetyna; KR – rybozyd kinetyny; LC-MS/MS – tandemowa spektrometria mas sprzężona z chromatografią ciecząową; NBTI – nitrobenzyltioinozyna; RFT – reaktywne formy tlenu.



Rycina 1. Schemat cyklu komórkowego.

lub komórkowych odpowiedzialnych za powielanie materiału genetycznego i wpływających na syntezę nukleotydów, które stanowią rdzeń cząstek wirusowych lub wchodzą w skład zmienionych genomowo komórek nowotworowych. Aby naturalny nukleozyd został włączony do syntetyzowanej nici DNA w komórce musi przejść trzystopniową fosforylację przy udziale kaskady wewnątrzkomórkowych kinaz. Podobnym przemianom metabolicznym podlegają wszystkie modyfikowane nukleozydy o działaniu przeciwnowotworowym, które dzięki właściwemu mechanizmowi molekularnemu są zdolne do indukowania programowanej śmierci komórki. Efektywność ich działania jest zróżnicowana i zależy od specyficzności enzymów metabolizujących oraz interakcji z białkami uczestniczącymi w procesach replikacji, naprawy i metylacji DNA.

AKTYWNOŚĆ PRZECIWNOWOTWOROWA ANALOGÓW NUKLEOZYDÓW

Modyfikowane nukleozydy i zasady azotowe jako leki przeciwnowotworowe były jedną z pierwszych grup cytostatyków stosowanych w onkologii. Wśród tych leków znalazły się pochodne purynowe oraz pirymidynowe, które znalazły zastosowanie zarówno w leczeniu nowotworów krwi jak i litych guzów nowotworowych. Historia badań nad nukleozydami i DNA rozpoczęła się już w 1847 r. od odkrycia pierwszego nukleotydu purynowego – 5'-fosforanu inozyny przez Justusa von Liebiga [6].

Analogi nukleozydowe purynowe, np. kładrybina, fludarabina, klofarabina oraz pirymidynowe, np. cytarabina, 5-azacytydyna stosowane są w leczeniu układu krwiotwórczego między innymi w przewlekłej białaczce limfatycznej [7-10]. Natomiast pirymidynowy analog – gemcytabina jest obecnie stosowany w leczeniu nowotworów litych takich jak rak piersi, niedrobnokomórkowy rak płuc, a także rak pęcherza [11-13]. Analogi urydyny takie jak 5-fluoro-2'-deoksyurydyna, oraz 5-fluoro-5'-deoksyurydyna są stosowane w leczeniu rozsianych nowotworów przewodu pokarmowego, trzustki, prostaty, piersi i jajników [14,15]. Ponadto analogi pirymidynowe takie jak: 2',3'-dideoksycytydyna (zalcytabina), 3'-azi-

do-3'-deoksytymidyna (zydowudyna) oraz analogi inozyny np. 2',3'-dideoksinozyna znalazły zastosowanie w terapii przeciwwirusowej [16-18]. Każdy z tych związków wykazuje zróżnicowaną aktywność w zależności od rodzaju schorzenia lub typu komórek. Dla przykładu, cytotoksyczna aktywność analogów puryny takich jak fludarabina i kładrybina w niedzielnących się komórkach wynika raczej z zaburzeń naprawy DNA niż z powodu terminacji replikacji czy wpływu na aktywność mitochondriów [19].

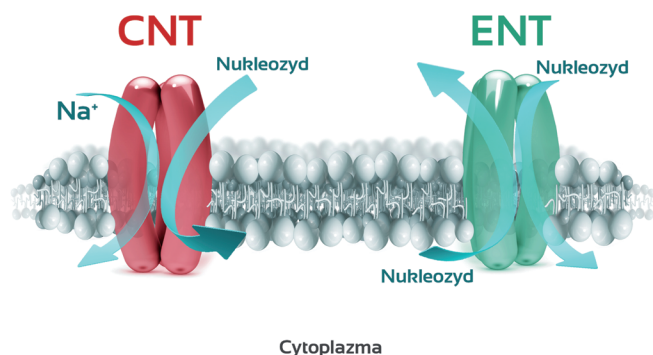
Wspólną cechą nukleozydów jest transport błonowy przy udziale białkowych transporterów, wewnątrzkomórkowa aktywacja oraz synteza nukleotydu [4]. Nukleozydy i ich analogi są związkami hydrofilowymi i aby przeniknąć do wnętrza komórki wymagają specyficznych białek transportujących. Istnieje coraz więcej dowodów, że liczebność oraz dystrybucja białkowych transporterów na powierzchni komórek jest przyczyną wrażliwości i specyficzności na analogi nukleozydów [20].

CHARAKTERYSTYKA SYSTEMÓW TRANSPORTOWYCH NUKLEOZYDÓW

Błony biologiczne (błony elementarne, błony cytoplazmatyczne, biomembrany) zbudowane są z dwuwarstwy białkowo-lipidowej i stanowią barierę przepuszczalności dla jonów i cząsteczek polarnych. Przepuszczalność jest możliwa dzięki obecności pomp i kanałów. Pompy transportują jony lub cząsteczki w kierunku wzrastającego stężenia, zużywając do tego energię w postaci wiązań wysokoenergetycznych ATP. Natomiast kanały umożliwiają szybki przepływ jonów w kierunku termodynamicznie korzystnym. Cząsteczki o charakterze hydrofilowym wymagają selektywnie działających transporterów, natomiast związki hydrofobowe przenikają na zasadzie dyfuzji [21].

Nukleozydy i ich analogi przechodzą przez błony plazmatyczne dzięki specyficznym białkom – transporterom nukleozydowym. Możemy wyróżnić transport bierny nośnikowy (ang. *sodium-independent equilibrative nucleoside transport*) lub transport drogą aktywnego symportu z jonami sodu (ang. *sodium-dependent equilibrative nucleoside transport*) [22, 23].

Pierwszy z nich, ENT (ang. *Equilibrative Nucleoside Transport system*) – transport Na^+ -niezależny, transportuje nukleozydy przez błonę komórkową w obu kierunkach na zasadzie dyfuzji ułatwionej zgodnie z gradientem stężeń (Ryc. 2). System ten dzielimy na dwa podtypy: *es* (ang. *equilibrative sensitive*) i *ei* (ang. *equilibrative insensitive*), w zależności od wrażliwości na inhibicję przez nitrobenzylotioinozynę (NBTI) [24, 25]. Zidentyfikowano cztery transportery należące do systemu Na^+ -niezależnego: ENT1, ENT2, ENT3 oraz ENT4 (Tab. 1). Transportery ENT1 i ENT3 zostały zaliczone do systemu *es* na podstawie wrażliwości na NBTI oraz ich selektywności substratowej. Natomiast ENT2, który nie jest hamowany przez ten inhibitor, należy do systemu *ei* [26]. Białka transportowe systemu ENT są szeroko rozpowszechnione w komórkach wielu typów i charakteryzują się niską selektywnością wobec przenoszonych cząsteczek [22]. Najlepiej poznane są transportery ENT1 i ENT2. Ludzkie białka ENT1 (hENT1) oraz ENT2 (hENT2), które są wrażliwe na NBTI, są ponadto hamowane przez związki



Rycina 2. Typy transporterów nukleozydowych. W systemie CNT nukleozydy są transportowane do wnętrza komórki w symporcie z jodem sodowym. Białka ENT transportują nukleozydy przez błonę komórkową w obu kierunkach zgodnie z gradientem stężeń.

rozszerzające naczynia takie jak: dipirydamol, dilazep i draflazyna [22,27].

W drugim systemie, CNT (ang. *Concentrative Nucleoside Transport system*), transport nukleozydów odbywa się tylko do wnętrza komórki w symporcie z jodem sodowym (Ryc. 2). W obrębie tego systemu wyszczególniono sześć funkcjonalnie różnych podsystemów (N1–N6), ze względu na różnice w przenoszonych substratach [24]. Dotąd poznano i opisano trzy białka transportowe systemu CNT oznaczane jako CNT1, CNT2 oraz CNT3. Transporter CNT1 jest białkiem swoicie przenoszącym nukleozydy pirymidynowe, CNT2 jest specyficzny w stosunku do nukleozydów purynowych, natomiast transporter CNT3 transportuje zarówno nukleozydy pirymidynowe jak i purynowe [28-31]. Dane dotyczące poszczególnych systemów transportowych zostały zestawione w tabeli 1.

Poza rodziną transporterów ENT oraz CNT znane są inne białka transportowe, które przemieszczają zarówno nukleozydy jak i ich analogi z komórki bądź do jej wnętrza. Ze względu na mechanizmy wykorzystywane do transportu wyróżnia się następujące rodziny transporterów: MRP (ang. *multidrug resistance protein*), PEPT (ang. *peptide transporter*), OAT (ang. *organic anion transporter*) oraz OCT (ang. *organic cation transporter*) [32].

Tabela 1. Porównanie systemów transportujących nukleozydy.

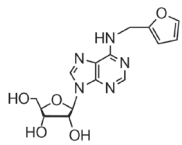
Systemy transportowe nukleozydów	Białko	Selektywność substratowa
es	ENT1	Nukleozydy purynowe, pirymidynowe
ei	ENT2	Nukleozydy purynowe, pirymidynowe i niektóre zasady
es	ENT3	Nukleozydy purynowe, pirymidynowe i zasady
?	ENT4	Nukleozydy purynowe
N1	CNT2	Nukleozydy purynowe, urydyna, formycyna B
N2	CNT1	Nukleozydy pirymidynowe
N3	CNT3	Nukleozydy purynowe, pirymidynowe
N4	-	Nukleozydy purynowe, pirymidynowe
N5	-	Analogi adenozyiny (formycyna B, fludarabina, kladrybina)
N6	-	Guanozyna

STRUKTURA CHEMICZNA CYTOKININ I ICH WYSTĘPOWANIE

Cytokiny stanowią jedną z głównych grup hormonów roślinnych. Stymulują procesy anaboliczne, cytokinezę, kariokinezę oraz tworzenie natywnej struktury białek. Ponadto hamują aktywność enzymów, które uczestniczą w degradacji kwasów nukleinowych i białek, przez co opóźniają procesy starzenia się komórek. Cytokiny są pochodnymi zasady purynowej – adeniny, w której przy N⁶ podstawiony jest najczęściej alifatyczny łańcuch izoprenowy lub podstawnik aromatyczny [33].

W roślinach najczęściej występują cytokiny z łańcuchem alifatycznym: *trans*-zeatyna, *cis*-zeatyna (N⁶-izopen-tenyloadenina), dihydrozeatyna i ich modyfikacje z podstawnikami metylowymi lub hydroksylowymi. Rzadziej spotykane są z podstawnikiem aromatycznym reprezentowanym przez N⁶-benzyloadeninę i jej hydroksylowane pochodne *m*- i *o*-topoliny. Związki te występują w mikro molarnych stężeniach w liściach topoli [34]. Do grupy syntetycznych analogów cytokinin zaliczamy: N⁶-farnesyloadeninę, N⁶-geranyloadeninę oraz do 1996 r. N⁶-furfuryloadeninę (kinetynę), kiedy to Barciszewski i wsp. [35] potwierdzili jej występowanie w komercyjnie dostępnym i świeżo wyizolowanym DNA. Cytokiny występują w postaci kilku form metabolicznych: wolnych zasad, rybozydów oraz 5'-fosforanów rybozydów (rybotydów). Nukleotydy te występują w pętli antykodonu tRNA, fragmencie poliadenylogowym mRNA oraz w rRNA, spełniając rolę regulacyjną w procesie translacji. Największą aktywność biologiczną wykazują cytokiny w formie wolnych zasad i połączeń rybozydowych [36].

Najlepiej poznaną cytokiną jest kinetyna, która po raz pierwszy została wyizolowana z DNA plemników śledzi w 1955 r. Jej występowanie potwierdzono, także w: komercyjnie dostępnym DNA, świeżo wyekstrahowanym z ludzkich komórek DNA oraz ekstraktach z komórek roślinnych i ludzkim moczu [35,37,38]. Kinetynę oraz jej rybozyd (Ryc. 3) również zidentyfikowano w płynnym endospermie młodych orzechów kokosowych (*Cocos nucifera* L.) za pomocą techniki LC-MS/MS. Średnie stężenia związków wynoszą odpowiednio 0,34 i 0,29 nM [39].



Rycina 3. Struktura rybozydu kinetyny (N^6 -furfurylo-adenozyny).

Kinetyna wykazuje właściwości antyoksydacyjne zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Chroni DNA komórek przed oksydacyjnymi uszkodzeniami, głównie guanozyny i gromadzeniem 8-oxo-dG [40]. Znane są jej właściwości spowalniania procesów starzenia się komórek roślinnych oraz ludzkich, m. in. fibroblastów [41-43]. Kinetyna w układzie bezkomórkowym i w wysokich stężeniach (500 nM i więcej) nie wykazuje aktywności przeciwutleniającej. W przeciwieństwie do tego, niskie dawki (stężenia do 100 nM) chronią keratynocyty Ha-CaT oraz promielocyty HL-60 przed stresem oksydacyjnym [44]. Kinetyna nie tylko wydłuża życie nicienia *Caenorhabditis elegans*, ale również zwiększa odporność na stres oksydacyjny i opóźnia proces starzenia się. Jest to działanie niezależne od czynnika transkrypcyjnego DAF-16, a zatem prawdopodobnie nie jest związane z szlakiem insulinopodobnego czynnika wzrostu. Wykazano również, że *C. elegans* przekształca kinetynę do rybozydu kinetyny oraz 5'-monofosforanu rybozydu kinetyny [45]. Kinetyna nie tylko odwraca alternatywny splicing pre-mRNA genu białkowego związanego z kinazą IκB (IKBKAP), który jest odpowiedzialny za tworzenie się różnicznej dysautonomii (FD) w modelu komórkowym [46-48], ale również w warunkach *in vivo* [49,50]. Kinetyna podawana przez 8 dni 29 zdrowym nosicielom głównej mutacji FD w dawce 23,5 mg/kg/dzień zwiększała włączanie egzonu 20 z endogennego genu. Istniała liniowa zależność między poziomem kinetyny w osoczu, a odpowiadającą zmianą logarytmiczną w ekspresji mRNA IKBKAP [49].

ANTYPROLIFERACYJNA AKTYWNOŚĆ N^6 -POCHODNYCH ADENOZYN

Naturalnie występujące analogi nukleozydów takie jak: N^6 -izopentenyloadenozyna (iPR), rybozyd kinetyny (KR) oraz N^6 -benzyloadenozyna (BAR) wykazują inhibicję wzrostu i indukcję apoptozy w komórkach nowotworowych [51-57]. Cytokininy w formie wolnych zasad, takie jak: N^6 -izopentenyloadenina (iP), kinetyna (K) oraz N^6 -benzyloadenina (BA) hamują proliferację komórek białaczkowych NB4, ML-1, U937 oraz powodują różnicowanie ich w dojrzałe granulocyty [58]. Wyniki korelują między stymulującym działaniem cytokinin na różnicowanie komórek w roślinach, a mechanizmem ich działania w procesie różnicowania się komórek białaczki szpikowej [51]. Z kolei rybozydy cytokinin zmniejszają proliferację komórek białaczki mieloidalnej HL-60 oraz czerniaka M4Beu i B16 [59]. Cytokininy powodują różnicowanie komórek nowotworowych w zakresie wysokich stężeń (25-100 μ M), podczas gdy ich rybozydy wywołują apoptozę komórek białaczkowych w stężeniach mikromolarnych [60]. KR, iPR, BAR obniżają zawartość wewnątrzkomórkowego ATP, indukują powstawanie zaburzeń w funkcjonowaniu mitochondriów oraz generują RFT, podczas gdy cytokininy (iP, K, BA) nie wykazują takiej aktywności. Wyznaczone wartości IC_{50} na linii komórkowej HL-60 dla cytokinin oraz ich rybozydów jako pochodnych adeniny zostały przedstawione w tabeli 2.

Stwierdzono również, że apoptozie stymulowanej przez KR oraz BAR towarzyszy znaczący wzrost aktywności kaspazy 3 i 9. Uwolniony do cytoplazmy z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów cytochrom c, wiąże się z prokaspazami rozpoczynając proces kaskadowej aktywacji kaspaz, prowadzący do apoptozy komórki. W komórkach nowotworowych traktowanych KR oraz BAR zaobserwowano apoptozę w obrębie jądra komórkowego. Była ona skutkiem kondensacji chromatyny częściowo zależnej od kaspaz i dostępności ATP oraz tworzenia ciałek apoptotycznych i fragmentacji DNA zależnej od kaspaz. Wykazano, że cytotoksyczny efekt rybozydów cytokinin jest związany z wzrostem aktywności określonych kaspaz oraz dostępnością wewnątrzkomórkowego ATP [60,61].

Badano wpływ N^6 -pochodnych adeniny i adenozyne na indukcję apoptozy w komórkach HL-60. Wykazano, że pochodne adenozyne oraz adeniny ulegają wewnątrz-komórkowej fosforylacji do monofosforanów. Analogi adenozyne były fosforylowane przez kinazę adenozyne (AdK). Z kolei pochodne adeniny były przetwarzane w analogiczne mononukleotydy za pomocą transferazy fosforybozylowej, której wydajność jest 50-100 razy mniejsza, aniżeli AdK. W związku z tym N^6 -pochodne adeniny okazały się niewystarczającym induktorem apoptozy. Natomiast zastosowanie inhibitorów AdK, które hamują reakcję fosforylacji N^6 -pochodnych adenozyne do odpowiednich monofosforanów zapobiegało procesowi apoptozy. Wynik ten wskazuje, że efekt wyzwalający apoptozę komórek za pomocą N^6 -pochodnych adenozyne związany jest z wewnątrzkomórkową aktywacją do odpowiednich mononukleotydów, których akumulacja prowadzi do indukcji zaprogramowanej śmierci komórki [62].

Kinaza adenozyne (AdK, EC 2.7.1.20) jest wewnątrzkomórkowym enzymem metabolizującym puryny (Ryc. 4), który odgrywa kluczową rolę w regulacji wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego stężenia adenozyne (Ado). AdK katalizuje reakcję fosforylacji Ado do AMP przy udziale drugiego substratu, Mg/ATP^{2-} . Ponadto AdK zaangażowana jest w procesy metylacji zachodzące w komórce. Niedobór AdK u transgenicznych myszy $AdK^{-/-}$ prowadzi do ostrego stłuszczenia wątroby i wczesnej śmiertelności urodzeniowej [63]. U ssaków, w tym u ludzi, występują dwie izoformy kinazy adenozynej. Rekombinowane białka obu izoform wykazują aktywność enzymatyczną oraz nie przejawiają żadnych różnic we właściwościach kinetycznych [64]. Sekwencje aminokwasów izoformy

Tabela 2. Efekt N^6 -pochodnych adeniny na przeżywalność komórek HL-60 [51].

Pochodne adeniny	IC_{50} (μ M)
Puryna	58,4
Adenina	261,0
Izopentenyloadenina	47,6
Kinetyna	48,8
Benzyloadenina	67,6
Trans-zeatyna	516,0
Adenozyne	685,0
Izopentenyloadenozyne	0,972
Rybozyd kinetyny	0,981
Rybozyd benzyloadeniny	0,706

długiej (AdK-L) oraz krótkiej (AdK-S) są identyczne za wyjątkiem N-końca, gdzie ludzka AdK-L zawiera dodatkowe 20–21 aminokwasów [65]. Wcześniejsze badania wskazują, że lokalizacja AdK-L znajduje się w jądrze komórkowym, a AdK-S w cytoplazmie [66]. Obie izoformy AdK ulegają ekspresji w różnych tkankach. Najwyższy poziom ekspresji AdK występuje w wątrobie i zmniejsza się w nerkach, płucach, sercu, mózgu oraz mięśniach szkieletowych [64,65]. W warunkach fizjologicznych poziom Ado wynosi 10–100 nM [67]. Enzymem odpowiedzialnym za utrzymanie takiego stężenia poza AdK jest deaminaza adenylozowa (ADA), która katalizuje deaminację Ado do inozyny. Wiadomo też, że powinowactwo adenylozyny do AdK ($K_M=1 \mu\text{M}$) jest wyższe niż do ADA ($K_M=25 \mu\text{M} - 150 \mu\text{M}$) [68–69]. Biorąc pod uwagę fakt, że poziom endogennej Ado osiąga wartości nanomolarne, zdaje się, że główną ścieżką regulacji poziomu Ado jest fosforylacja przez AdK. Inną możliwą drogą inaktywacji Ado jest odwracalna reakcja katalizowana przez hydrolazę SAH, która prowadzi do utworzenia S-adenozylhomocysteiny (SAH) z adenylozyny i L-homocysteiny [70]. Kinaza adenylozowa posiada szeroką specyficzność substratową, rozpoznaje pochodne adenylozyny podstawione w zasadzie purynowej w pozycji C²-, N⁶-, N⁷- oraz C⁸- [71]. Modyfikacja części cukrowej jest dobrze tolerowana, ale obniża wydajność fosforylacji 2–5 krotnie. Jedynym wymogiem jaki substrat AdK musi spełniać jest obecność zasady purynowej oraz grupy 2'-OH rybozy, która jest niezbędna do aktywacji tego enzymu. Ponadto grupa 2'-OH musi być w konformacji *trans* w stosunku do pierścienia purynowego [71]. Związki takie jak: α -adenozyna czy β -D-arabinozylo-8-azaadenina nie są fosforylowane przez AdK ze względu na konformację *cis* grupy 2'-hydroksylowej względem zasady purynowej [71]. Jedną z bezpośrednich konsekwencji szerokiej specyficzności substratowej AdK wobec nukleozydów jest aktywacja dużej liczby antymetabolitów. Jednym z nich jest fludarabina, która po wnikięciu do komórki ulega fosforylacji i wywołuje efekt cytotoksyczny poprzez zaburzenie integralności DNA komórki [72]. Dowiedziono również, że selektywną cytotoksyczność komórek raka okrężnicy ludzkiej można osiągnąć w oparciu o nadekspresję białka AdK [73]. Co należy podkreślić, w badaniach klinicznych znajduje się nowa trycykliczna pochodna adenylozyny (Triciribine) fosforylowana przez AdK do aktywnej postaci, która jest inhibitorem kinazy białkowej B. Związek

ten zaproponowano jako terapeutyk do spersonalizowanej terapii przeciwnowotworowej opartej o profilowanie ekspresji AdK u chorego [74].

WPŁYW RYBOZYDU KINETYNY NA CYKL KOMÓRKOWY I APOPTOZĘ

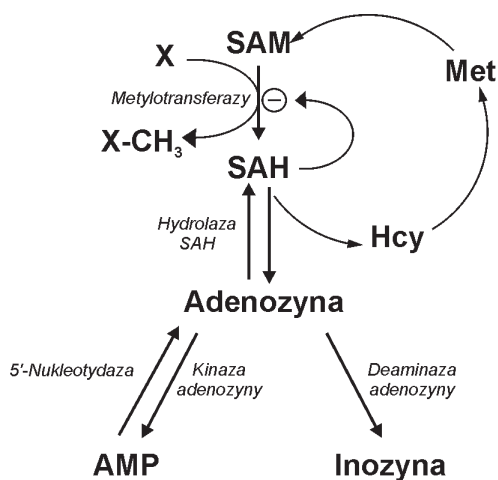
Pierwsze eksperymenty wykazujące zdolność hamowania proliferacji komórek nowotworowych i nienowotworowych przez KR zostały wykonane na początku drugiej połowy XX wieku na ludzkich kulturach komórkowych linii naskórka, raka sutka i jego przewlekłego zapalenia torbielowatego. Użyte stężenie związku okazało się skuteczne do zahamowania proliferacji komórek [75]. Stwierdzono również zatrzymanie proliferacji i indukcję apoptozy w roślinnych komórkach nowotworowych indukowanych przez zakażenie *Agrobacterium tumefaciens* [59].

Zaobserwowano, że KR wpływa na przebieg cyklu komórkowego, jednakże wyniki badań różnią się w zależności od zastosowanego modelu doświadczalnego. Cheong i wsp. [53] wykazali w linii komórek raka wątrobowokomórkowego HepG2, że KR zatrzymuje cykl komórkowy w fazie G₂/M, poprzez obniżenie odsetka komórek w fazie G₀/G₁ i zwiększenie w G₂/M. Zatrzymaniu cyklu towarzyszyła zmiana morfologii oraz znaczny spadek proliferacji komórek w zależności od zastosowanej dawki (IC₅₀=8,33 mg/l). Pomimo, że nie stwierdzono aktywacji kaspazy-3, zdaniem autorów tłumienie przejścia z fazy G₁ do S cyklu komórkowego jest konsekwencją ingerencji związku w łańcuch transportu elektronów zachodzący w mitochondriach.

Wykazano ponadto, że KR indukuje cytotoksyczność zależną od dawki w komórkach raka okrężnicy HCT-15 dla których wartość IC₅₀ wynosi 2,5 μM . Przeżywalność komórek HCT-15 nie ulegała zmianie przy stężeniu mniejszym niż 0,5 μM , natomiast hamowanie proliferacji o 15%, 35% oraz 70% występowało po 4 dniowej inkubacji w obecności odpowiednio 0,5 μM , 1 μM i 25 μM stężeń KR. Następowaly zmiany morfologiczne typowe dla procesu apoptozy, tj. utrata przyczepności, zaokrąglenie i kurczenie się komórek oraz oderwanie od podłoża. Analiza cyklu komórkowego wykazała, że przy stężeniu 5 μM KR następowało zwiększenie odsetka komórek w fazie G₂/M i S oraz zmniejszenie w fazie G₀/G₁. Zahamowanie zdolności klonogennej komórek HCT-15 obserwowano po 2,5 μM eskpozycji na KR. Czas trwania testu wyniósł 14 dni [76].

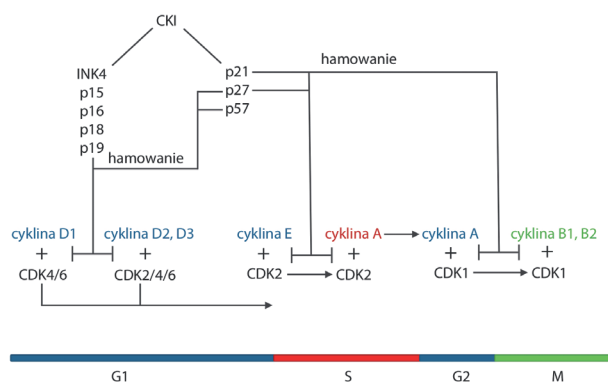
Antyproliferacyjny i proapoptotyczny mechanizm działania KR związany jest z hamowaniem ekspresji genów kodujących cykliny [54]. Kinazy cyklinozależne (CDK) są regulatorami różnych faz cyklu komórkowego komórek eukariotycznych. Regulacja cyklu komórkowego i wzrost są ze sobą ściśle związane. Aktywacja CDK zachodzi przez przyłączenie cykliny wraz z fosforylacją reszty treoninowej przez kinazę aktywującą CDK (CAK). Niewłaściwa ekspresja lub mutacje w genach kodujących CDK, cykliny lub inhibitory CDK występują w wielu typach nowotworów.

Do tej pory zidentyfikowano szesnaście cyklin, jednak tylko niektóre biorą aktywny udział w przebiegu cyklu [77]. Cykliny D (D1, D2, D3) tworzą kompleksy z kinazami CDK4 i CDK6, odpowiedzialnymi za modulację przebiegu fazy G₁ oraz nie-



Rycina 4. Metabolizm adenylozyny (opis w tekście); SAM, S-adenozylometionina; SAH, S-adenozylhomocysteina; Met, metionina; Hcy, homocysteina; X, akceptor grupy metylowej; X-CH₃, zmetylowany związek; na podstawie [63].

zbędnymi do zapoczątkowania replikacji DNA w fazie S poprzez fosforylację kluczowych dla cyklu komórkowego białek, np. Rb. Cyklina E oraz A łączy się z CDK2 w czasie przejścia między fazami G₁/S, a następnie w trakcie fazy S. Cykliny B wiążą się z CDK1 podczas fazy M. Ponadto aktywność CDK podlega hamowaniu przez inhibitory CDK (CKI). Wyróżnia się dwie grupy CKI. Rodzinę INK4 tworzą białka: p15, p16, p18 oraz p19, które wiążąc się z CDK4 i CDK6 uniemożliwiają ich połączenie z cyklinami D. Do rodziny Cip/Kip należą białka: p21, p27 oraz p57, które hamują aktywność CDK1 i CDK2 [77,78]. Złożoność zależności między czynnikami mającymi wpływ na przebieg cyklu komórkowego ilustruje rycina 5.



Rycina 5. Regulacja cyklu komórkowego w czasie jego trwania. Opis w tekście.

Tiedemann i wsp. [54] wykazali natomiast, że KR obniża poziom ekspresji cykliny D1 i D2 poprzez hamowanie *cis*- oraz *trans*-aktywacji genów CCND1 i CCND2 w pierwotnych hodowlach komórek szpiczaka mnogiego, co skutkuje aresztem cyklu komórkowego w fazie G₀/G₁. W zdrowych komórkach zachodzi koekspresja cyklin D1, D2 oraz D3, które zamiennie spełniają swoje funkcje tworząc kompleksy z CDK4 i CDK6 [79]. Z kolei komórki szpiczaka mnogiego, a także inne nowotwory układu krwiotwórczego wykazują nadekspresję tylko jednej z cyklin D. Zablockowanie ekspresji genów indywidualnych cyklin stanowi skuteczniejszy cel terapii przeciwnowotworowej aniżeli stosowanie inhibitorów CDK będących obecnie w trakcie badań klinicznych. Na poziomie molekularnym nowotwory te znacznie różnią się od zdrowych tkanek pod względem jakościowym i ilościowym w ekspresji genów dla cyklin D, natomiast w przypadku CDK różnica ta jest niewielka. W grupie szpiczaka mnogiego 54% nowotworów wykazuje nadekspresję genu cykliny D1 (CCND1), 48% nadekspresję genu cykliny D2 (CCND2), 3% nadekspresję genu cykliny D3 (CCND3) a 8% jednoczesną nadekspresję genów CCND1 oraz CCND2 [80]. Badania przeprowadzone na 12 liniach komórek białaczkowych charakteryzujących się znaczną nadekspresją cykliny D1 oraz D2, wykazały efekt antyproliferacyjny KR (IC₅₀ < 15 μM, 72 godziny) oraz spadek ilości cyklin D1 i D2 w ciągu 6 godzin od momentu inkubacji ze związkiem. Natomiast nie stwierdzono zmian w poziomie cykliny D3. Badając mechanizm wyciszenia ekspresji cyklin D1 i D2 wykazano, że KR blokuje *trans*- oraz *cis*-aktywację genów CCND2 i CCND1 w znacznej mierze indukowaną cAMP, poprzez nadekspresję represora transkrypcji należącego do rodziny białek CREM

(ang. *cAMP-response element modulator*). Ponadto KR skutecznie wycisza *trans*-aktywację genu CCND2 spowodowaną nadekspresją czynnika transkrypcyjnego MAF, który bezpośrednio łączy się z promotorem genu CCND2. Wynik ten sugeruje, że pod wpływem KR dochodzi do mobilizacji represorów transkrypcji dla promotora CCND2 lub zachodzi spadek kluczowych kofaktorów wymaganych do transkrypcji genu CCND2. Następnie sprawdzono czy wstrzymanie ekspresji cykliny D1 i D2 jest bezpośrednim efektem działania KR, czy może rezultatem aresztu cyklu komórkowego w fazie S, kiedy to fizjologicznie dochodzi do spadku ekspresji genów CCND1 i CCND2. W ciągu 20-godzinnej inkubacji, KR powodował zmniejszenie odsetka komórek w fazie S cyklu o 50-70% oraz zwiększenie w fazie G₀/G₁. Dane te sugerują, że mechanizm zatrzymania cyklu komórkowego wynika z bezpośredniego hamowania ekspresji genów cykliny D1 i D2. Cabello i wsp. [61] wykazali w linii komórek raka trzustki MIA Paca-2 oraz czerniaka złośliwego A375, że KR zwiększa ekspresję genu CDKN1A kodującego białko p21, które w odpowiedzi na stres cytotoksyczny hamuje cykl komórkowy w fazie G₀/G₁ oraz G₂/M. Znaczącą akumulację komórek MIA PaCa-2 i A375 obserwowano w fazie G₂/M w czasie 24-godzinnej hodowli. Wydłużenie czasu inkubacji do 72 godzin zwiększało odsetek komórek w fazie G₂/M i spadek w fazie S cyklu.

Choi i wsp. [55], a także Cabello i wsp. [61] badali zdolność rybozydu kinetyny do indukcji apoptozy poprzez mechanizm wewnątrzkomórkowy, wywołujący depolaryzację błony mitochondrialnej. Szlak wewnętrzny apoptozy – mitochondrialny ulega aktywacji na skutek stresu oksydacyjnego, uszkodzeń DNA oraz wzrostu tlenu azotu i stężenia jonów Ca²⁺ [81]. Do najbardziej poznanych czynników regulatorowych apoptozy, wpływających na zmiany przepuszczalności błony mitochondrialnej, należą białka z rodziny Bcl-2. W jej skład wchodzi białka proapoptotyczne i antyapoptotyczne, które działają antagonistycznie. Interakcja między czynnikami: antyapoptotycznym i proapoptotycznym stwarza podstawy modulowania programowanej śmierci komórki. Deregulacja białek Bcl-2 prowadzi do obumarcia komórek lub nadmiernej ich proliferacji, takiej jaka charakteryzuje choroby neurodegeneracyjne lub nowotwory. Pomimo tego, że mutacje w obrębie rodziny białek Bcl-2 występują rzadko, stwierdzono, że nadekspresja białek antyapoptotycznych Bcl-2 oraz Bcl-X_l jest zjawiskiem powszechnym w komórkach nowotworowych. Zablockowanie funkcji tych białek przez inhibitor niskocząsteczkowy ABT-737 wzmacnia apoptozę w ludzkich komórkach białaczkowych [82]. Ponadto terapia oligonukleotydami antysensownymi skierowanymi przeciwko mRNA Bcl-2 zwiększa odsetek komórek ulegających apoptozie [83].

Wykazano, że antyproliferacyjna aktywność KR jest związana z modulacją rodziny białek Bcl-2 oraz kaspazy-3. Eksperymenty przeprowadzono na dwóch liniach nowotworowych: ludzkim raku szyjki macicy (HeLa) i mysim czerniaku (B16F-10) oraz na dwóch liniach nienowotworowych: ludzkich fibroblastach skóry (CCL-116) i pierwotnych fibroblastach bydłęcych. W czasie 24-godzinnej inkubacji komórek HeLa i B16F-10 z KR (1 μM–1 mM) zaobserwowano zależny od stężenia efekt cytotoksyczny związku. W tym samym czasie nie zauważono istotnych zmian w przeżywalności fibroblastów obu linii. Barwienie aneksyną V i jodkiem propidyny potwierdziło działanie cytotoksyczne KR w komórkach HeLa

wynikające z indukcji procesu apoptozy. Wykazano zdolność KR do nadmiernej aktywacji PARP-1 (ang. *poly ADP-ribose polymerase*) oraz fragmentacji DNA. Ponadto barwienie jąder komórkowych barwnikiem Hoechst33258 uwidoczniło ich fragmentację, która jest charakterystycznym objawem zaprogramowanej śmierci komórki. W kolejnym etapie zbadano wpływ KR na funkcjonowanie mitochondriów. Wykazano, że w komórkach nowotworowych HeLa KR powodował mitochondrialne dysfunkcje poprzez stymulację proapoptycznych białek Bad i Bak oraz inhibicję antyapoptycznych białek Bcl-2 i Bcl-X_L. Zaburzenie równowagi białek rodziny Bcl-2 skutkowało uwolnieniem cytochromu c oraz aktywacją kaspazy-3, przyczyniając się do śmierci komórek nowotworowych. W tym samym czasie w fibroblastach CCL-116 nie wykazano wzrostu aktywności kaspazy-3 oraz związanego z tym efektu cytotoksycznego. W celu potwierdzenia indukcji apoptozy zależnej od aktywacji kaspazy-3 zastosowano inhibitor kaspaz – zVAD-fmk pod wpływem, którego doszło do skutecznego zablokowania kaspazy-3, a śmiertelność komórek HeLa była statystycznie nieistotna [55]. Podobnie, KR w komórkach raka trzustki MIA PaCa-2 powoduje utratę potencjału błony mitochondrialnej, uwolnienie cytochromu c do cytoplazmy oraz aktywację kaspazy-3 [61].

Zaobserwowano, że KR wykazuje zdolność do szybkiego i znacznego obniżenia wewnątrzkomórkowego ATP i akumulacji reaktywnych form tlenu, co w konsekwencji prowadzi do stresu genotoksycznego i nadekspresji genów uszkodzających DNA (HMOX1, DDIT3, GADD45A) w komórkach raka trzustki MIA PaCa-2 oraz czerniaka złośliwego A375 [61].

Potwierdzono również, że KR hamuje wzrost czerniaka złośliwego w modelu *in vivo*. W tym celu posłużono się mysim modelem z wszczepionymi podskórnie komórkami czerniaka złośliwego. Bezpośrednie zastrzyki KR w okolicę guza w dawce 40 mg/kg masy ciała doprowadziły do znaczącej redukcji masy nowotworowej. Podobny efekt uzyskano stosując dawkę 20 mg/kg dakarbazy – cytostatyku alkilującego używanego w leczeniu czerniaka. Wyniki potwierdzają selektywną skuteczność cytotoksyczną KR zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [55].

Cytotoksyczność rybozydu kinetyny jest zależna od poziomu ekspresji kinazy adenozynowej (AdK) i znoszona przez zastosowanie jej inhibitorów. Wyciszenie ekspresji genu kinazy adenozynowej za pomocą RNAi w linii czerniaka złośliwego A375 objawiało się całkowitym znoszeniem antyproliferacyjnej aktywności KR. Podobny efekt obserwowano po zastosowaniu inhibitora nukleozydowego AdK – 5'-amino-5'-deoxyadenozyny (d'-AdA). W hodowli komórkowej raka trzustki MIA PaCa-2 blokowanie ekspresji genu kinazy skutkowało wysoką cytotoksycznością i tylko inhibicja białka za pomocą d'-AdA chroniła komórki przed proapoptycznym działaniem KR [61].

PODSUMOWANIE

Jedno z podstawowych założeń przeciwnowotworowego działania rybozydu kinetyny wpisuje się w prowadzone obecnie intensywne poszukiwanie leków aktywowanych bezpośrednio w komórce nowotworowej. Koncepcja ta oparta jest na spostrzeżeniu, że w komórkach nowotworowych często

dochodzi do zwiększonej ekspresji charakterystycznych dla danego typu nowotworu enzymów, które nie są obecne w komórkach prawidłowych lub ich ekspresja jest ograniczona [84]. Poszukiwane są więc cząsteczki, które mogą ulegać aktywacji w komórkach nowotworowych za sprawą specyficznie występujących w nich enzymów. Poszczególne pochodne KR wskazują wyraźnie na drogę wewnątrzkomórkowego przekształcania związku do monofosforanu, który zostaje przekształcony w komórce nowotworowej do difosforanu, a następnie trifosforanu jako aktywna forma związku. W tym przypadku enzymem, który katalizuje pierwszy etap biotransformacji KR do aktywnego metabolitu – monofosforanu KR jest kinaza adenozynowa [76,85].

PIŚMIENNICTWO

- Dobrek Ł, Szcześniak P, Thor P, Orszulak-Michalak D (2008) Aktualne kierunki w poszukiwaniach nowych leków przeciwnowotworowych. *Geriatrics* 2: 37-46
- Jędrzejczak WW (2003) Poszukiwanie postępu w chemioterapii nowotworów. *Współczesna Onkologia* 7: 6-10
- Mlejnek P, Prochazka S (2002) Activation of caspase-like proteases and induction of apoptosis by isopentenyladenosine in tobacco BY-2 cells. *Planta* 215: 158-166
- Galmarini CM, Mackey JR, Dumontet C (2001) Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. *Leukemia* 15: 875-890
- Ewald B, Sampath D, Plunkett W (2008) Nucleoside analogs: molecular mechanisms signaling cell death. *Oncogene* 27: 6522-6537
- Liebig J (1847) Ribosyl purine nucleotides of muscle. *Muscle inosinic acid (5-phospho-inosine)*. *Ann Chem* 62: 257-259
- Bonate PL, Arthaud L, Cantrell WR, Jr., Stephenson K, Secrist JA, 3rd, Weitman S (2006) Discovery and development of clofarabine: a nucleoside analogue for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 5: 855-863
- Bryson HM, Sorkin EM (1993) Cladribine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in haematological malignancies. *Drugs* 46: 872-894
- Pastor-Anglada M, Molina-Arcas M, Casado FJ, Bellosillo B, Colomer D, Gil J (2004) Nucleoside transporters in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 18: 385-393
- Ricci F, Tedeschi A, Morra E, Montillo M (2009) Fludarabine in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: a review. *Ther Clin Risk Manag* 5: 187-207
- Jones J, Takeda A, Tan SC, Cooper K, Loveman E, Clegg A (2009) Gemcitabine for the treatment of metastatic breast cancer. *Health Technol Assess* 13 Suppl 2: 1-7
- Toschi L, Cappuzzo F (2009) Gemcitabine for the treatment of advanced nonsmall cell lung cancer. *Onco Targets Ther* 2: 209-217
- Shelley MD, Cleves A, Wilt TJ, Mason MD (2011) Gemcitabine chemotherapy for the treatment of metastatic bladder carcinoma. *BJU Int* 108: 168-179
- Galmarini CM, Mackey JR, Dumontet C (2002) Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. *Lancet Oncol* 3: 415-424
- Shore S, Raraty MG, Ghaneh P, Neoptolemos JP (2003) Review article: chemotherapy for pancreatic cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 18: 1049-1069
- Fischl MA, Richman DD, Saag M, Meng TC, Squires KE, Holden-Wiltse J, Meehan PM (1997) Safety and antiviral activity of combination therapy with zidovudine, zalcitabine, and two doses of interferon-alpha2a in patients with HIV. *AIDS Clinical Trials Group Study 197*. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 16: 247-253
- Graham KA, Leithoff J, Coe IR, Mowles D, Mackey JR, Young JD, Cass CE (2000) Differential transport of cytosine-containing nucleosides by recombinant human concentrative nucleoside transporter protein hCNT1. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 19: 415-434

18. Mukherji E, Au JL, Mathes LE (1994) Differential antiviral activities and intracellular metabolism of 3'-azido-3'-deoxythymidine and 2',3'-dideoxyinosine in human cells. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 1573-1579
19. Robak P, Robak T (2013) Older and new purine nucleoside analogs for patients with acute leukemias. *Cancer Treat Rev* 39: 851-861
20. Mackey JR, Baldwin SA, Young JD, Cass CE (1998) The role of nucleoside transport in anticancer drug resistance. *Drug Resistance Updates* 1: 310-324
21. Alberts BBD, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2005) *Podstawy biologii komórki. Wprowadzenie do biologii molekularnej*, Polskie Wydawnictwo Naukowe, Warszawa
22. Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, King AE, Cass CE, Young JD (2004) The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch* 447: 735-743
23. Cabrita MA, Baldwin SA, Young JD, Cass CE (2002) Molecular biology and regulation of nucleoside and nucleobase transporter proteins in eukaryotes and prokaryotes. *Biochem Cell Biol* 80: 623-638
24. Baldwin SA, Mackey JR, Cass CE, Young JD (1999) Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. *Mol Med Today* 5: 216-224
25. Cass CE, Young JD, Baldwin SA (1998) Recent advances in the molecular biology of nucleoside transporters of mammalian cells. *Biochem Cell Biol* 76: 761-770
26. Podgórska M, Kocbuch K, Pawelczyk T (2005) Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters. *Acta Biochim Pol* 52: 749-758
27. Griffiths M, Yao SY, Abidi F, Phillips SE, Cass CE, Young JD, Baldwin SA (1997) Molecular cloning and characterization of a nitrobenzylthioinosine-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter from human placenta. *Biochem J* 328: 739-743
28. Kong W, Engel K, Wang J (2004) Mammalian nucleoside transporters. *Curr Drug Metab* 5: 63-84
29. Pastor-Anglada M, Cano-Soldado P, Errasti-Murugarren E, Casado FJ (2008) SLC28 genes and concentrative nucleoside transporter (CNT) proteins. *Xenobiotica* 38: 972-994
30. Gray JH, Owen RP, Giacomini KM (2004) The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch* 447: 728-734
31. Smith KM, Slugoski MD, Loewen SK, Ng AM, Yao SY, Chen XZ, Karpinski E, Cass CE, Baldwin SA, Young JD (2005) The broadly selective human Na⁺/nucleoside cotransporter (hCNT3) exhibits novel cation-coupled nucleoside transport characteristics. *J Biol Chem* 280: 25436-25449
32. You G, Morris ME, Wang B: *Drug (2014) Transporters: Molecular Characterization and Role in Drug Disposition*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken
33. Skoog F, Strong FM, Miller CO (1965) Cytokinins. *Science* 148: 532-533
34. Hewett EW, Wareing PF (1973) Cytokinins in *Populus x robusta* Schneid: A complex in leaves. *Planta* 112: 225-233
35. Barciszewski J, Siboska GE, Pedersen BO, Clark BF, Rattan SI (1996) Evidence for the presence of kinetin in DNA and cell extracts. *FEBS Lett* 393: 197-200
36. Sakakibara H (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu Rev Plant Biol* 57: 431-449
37. Miller CO, Skoog F, Okumura FS, Von Saltza MH, Strong FM (1956) Isolation, Structure and Synthesis of Kinetin, a Substance Promoting Cell Division. *J Am Chem Soc* 78: 1375-1380
38. Barciszewski J, Massino F, Clark BF (2007) Kinetin—a multiactive molecule. *Int J Biol Macromol* 40: 182-192
39. Yong JW, Ge L, Ng YF, Tan SN (2009) The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules* 14: 5144-5164
40. Olsen A, Siboska GE, Clark BF, Rattan SI (1999) N(6)-Furfuryladenine, kinetin, protects against Fenton reaction-mediated oxidative damage to DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 265: 499-502
41. Rattan SI, Clark BF (1994) Kinetin delays the onset of ageing characteristics in human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 201: 665-672
42. Kowalska E (1992) Influence of kinetin (6-furfurylo-amino-purine) on human fibroblasts in the cell culture. *Folia Morphol (Warsz)* 51: 109-118
43. Jablonska-Trypuc A, Matejczyk M, Czerpak R (2016) N6-benzyladenine and kinetin influence antioxidative stress parameters in human skin fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 413: 97-107
44. Othman EM, Naseem M, Awad E, Dandekar T, Stopper H (2016) The Plant Hormone Cytokinin Confers Protection against Oxidative Stress in Mammalian Cells. *PLoS One* 11: e0168386
45. Kadlecova A, Jirsa T, Novak O, Kammenga J, Strnad M, Voller J (2018) Natural plant hormones cytokinins increase stress resistance and longevity of *Caenorhabditis elegans*. *Biogerontology* 19: 109-120
46. Slaugenhaupt SA, Mull J, Leyne M, Cuajungco MP, Gill SP, Hims MM, Quintero F, Axelrod FB, Gusella JF (2004) Rescue of a human mRNA splicing defect by the plant cytokinin kinetin. *Hum Mol Genet* 13: 429-436
47. Salani M, Urbina F, Brenner A, Morini E, Shetty R, Gallagher CS, Law EA, Sunshine S, Finneran DJ, Johnson G, Minor L, Slaugenhaupt SA (2019) Development of a screening platform to identify small molecules that modify ELP1 pre-mRNA splicing in familial dysautonomia. *SLAS Discov* 24: 57-67
48. Hims MM, Ibrahim EC, Leyne M, Mull J, Liu L, Lazaro C, Shetty RS, Gill S, Gusella JF, Reed R, Slaugenhaupt SA (2007) Therapeutic potential and mechanism of kinetin as a treatment for the human splicing disease familial dysautonomia. *J Mol Med (Berl)* 85: 149-161
49. Gold-von Simson G, Goldberg JD, Rolnitzky LM, Mull J, Leyne M, Vo-stianiouk A, Slaugenhaupt SA, Axelrod FB (2009) Kinetin in familial dysautonomia carriers: implications for a new therapeutic strategy targeting mRNA splicing. *Pediatr Res* 65: 341-346
50. Axelrod FB, Liebes L, Gold-Von Simson G, Mendoza S, Mull J, Leyne M, Norcliffe-Kaufmann L, Kaufmann H, Slaugenhaupt SA (2011) Kinetin improves IKBKAP mRNA splicing in patients with familial dysautonomia. *Pediatr Res* 70: 480-483
51. Ishii Y, Hori Y, Sakai S, Honma Y (2002) Control of differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia cells by cytokinins and cytokinin nucleosides, plant redifferentiation-inducing hormones. *Cell Growth Differ* 13: 19-26
52. Voller J, Zatloukal M, Lenobel R, Dolezal K, Beres T, Krystof V, Spichal L, Niemann P, Dzubak P, Hajdich M, Strnad M (2010) Anticancer activity of natural cytokinins: a structure-activity relationship study. *Phytochemistry* 71: 1350-1359
53. Cheong J, Goh D, Yong JW, Tan SN, Ong ES (2009) Inhibitory effect of kinetin riboside in human hepatoma, HepG2. *Mol Biosyst* 5: 91-98
54. Tiedemann RE, Mao X, Shi CX, Zhu YX, Palmer SE, Sebag M, Marler R, Chesi M, Fonseca R, Bergsagel PL, Schimmer AD, Stewart AK (2008) Identification of kinetin riboside as a repressor of CCND1 and CCND2 with preclinical antimyeloma activity. *J Clin Invest* 118: 1750-1764
55. Choi BH, Kim W, Wang QC, Kim DC, Tan SN, Yong JW, Kim KT, Yoon HS (2008) Kinetin riboside preferentially induces apoptosis by modulating Bcl-2 family proteins and caspase-3 in cancer cells. *Cancer Lett* 261: 37-45
56. Rogalinska M, Goralski P, Blonski JZ, Robak P, Barciszewski J, Koceva-Chyla A, Piekarski H, Robak T, Kilianska ZM (2017) Personalized therapy tests for the monitoring of chronic lymphocytic leukemia development. *Oncol Lett* 13: 2079-2084
57. Framski G, Wawrzyniak D, Jahnz-Wechmann Z, Szymanska-Michalak A, Kraszewski A, Barciszewski J, Boryski J, Stawinski J (2016) Searching for anti-glioma activity. Ribonucleoside analogues with modifications in nucleobase and sugar moieties. *Acta Biochim Pol* 63: 765-771
58. Honma Y, Ishii Y (2002) Differentiation of human myeloid leukemia cells by plant redifferentiation-inducing hormones. *Leuk Lymphoma* 43: 1729-1735
59. Griffaut B, Bos R, Maurizis JC, Madelmont JC, Ledoigt G (2004) Cytotoxic effects of kinetin riboside on mouse, human and plant tumour cells. *Int J Biol Macromol* 34: 271-275

60. Mlejnek P (2001) Caspase inhibition and N⁶-benzyladenosine-induced apoptosis in HL-60 cells. *J Cell Biochem* 83: 678-689
61. Cabello CM, Bair WB 3rd, Ley S, Lamore SD, Azimian S, Wondrak GT (2009) The experimental chemotherapeutic N⁶-furfuryladenosi- ne (kinetin-riboside) induces rapid ATP depletion, genotoxic stress, and CDKN1A(p21) upregulation in human cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 77: 1125-1138
62. Mlejnek P, Dolezel P (2005) Apoptosis induced by N⁶-substituted derivatives of adenosine is related to intracellular accumulation of corresponding mononucleotides in HL-60 cells. *Toxicol In Vitro* 19: 985-990
63. Boison D, Scheurer L, Zumsteg V, Rulicke T, Litynski P, Fowler B, Brandner S, Mohler H (2002) Neonatal hepatic steatosis by disruption of the adenosine kinase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6985-6990
64. Sahin B, Kansy JW, Nairn AC, Spsychala J, Ealick SE, Fienberg AA, Greene RW, Bibb JA (2004) Molecular characterization of recombinant mouse adenosine kinase and evaluation as a target for protein phosphorylation. *Eur J Biochem* 271: 3547-3555
65. Sakowicz M, Grden M, Pawelczyk T (2001) Expression level of adenosine kinase in rat tissues. Lack of phosphate effect on the enzyme activity. *Acta Biochim Pol* 48: 745-754
66. Cui XA, Singh B, Park J, Gupta RS (2009) Subcellular localization of adenosine kinase in mammalian cells: The long isoform of AdK is localized in the nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 388: 46-50
67. Deussen A, Stappert M, Schafer S, Kelm M (1999) Quantification of extracellular and intracellular adenosine production: understanding the transmembranous concentration gradient. *Circulation* 99: 2041-2047
68. Ford H Jr, Dai F, Mu L, Siddiqui MA, Nicklaus MC, Anderson L, Marquez VE, Barchi JJ Jr (2000) Adenosine deaminase prefers a distinct sugar ring conformation for binding and catalysis: kinetic and structural studies. *Biochemistry* 39: 2581-2592
69. Drabikowska AK, Halec L, Shugar D (1985) Purification and properties of adenosine kinase from rat liver: separation from deoxyadenosine kinase activity. *Z Naturforsch C* 40: 34-41
70. Latini S, Pedata F (2001) Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem* 79: 463-484
71. Bennett LL Jr, Hill DL (1975) Structural requirements for activity of nucleosides as substrates for adenosine kinase: orientation of substituents on the pentofuranosyl ring. *Mol Pharmacol* 11: 803-808
72. Parker WB, Secrist JA 3rd, Waud WR (2004) Purine nucleoside antimetabolites in development for the treatment of cancer. *Curr Opin Investig Drugs* 5: 592-596
73. Giglioni S, Leoncini R, Aceto E, Chessa A, Civitelli S, Bernini A, Tazini G, Carraro F, Pucci A, Vannoni D (2008) Adenosine kinase gene expression in human colorectal cancer. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 27: 750-754
74. Shedden K, Townsend LB, Drach JC, Rosania GR (2003) A rational approach to personalized anticancer therapy: chemoinformatic analysis reveals mechanistic gene-drug associations. *Pharm Res* 20: 843-847
75. Orr MF, McSwain B (1960) The effect of kinetin, kinetin ribofuranoside and gibberellic acid upon cultures of skin and mammary carcinoma and cystic disease. *Cancer Res* 20: 1362-1364
76. Rajabi M, Gorincioi E, Santaniello E (2012) Antiproliferative Activity of Kinetin Riboside on HCT-15 Colon Cancer Cell Line. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 31: 474-481
77. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36: 131-149
78. Park MT, Lee SJ (2003) Cell cycle and cancer. *J Biochem Mol Biol* 36: 60-65
79. Carthon BC, Neumann CA, Das M, Pawlyk B, Li T, Geng Y, Sicinski P (2005) Genetic replacement of cyclin D1 function in mouse development by cyclin D2. *Mol Cell Biol* 25: 1081-1088
80. Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J Jr (2005) Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood* 106: 296-303
81. Daniel PT (2000) Dissecting the pathways to death. *Leukemia* 14: 2035-2044
82. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, Bruncko M, Deckwerth TL, Dinges J, Hajduk PJ, Joseph MK, Kitada S, Korsmeyer SJ, Kunzer AR, Letai A, Li C, Mitten MJ, Nettesheim DG, Ng S, Nimmer PM, O'Connor JM, Oleksijew A, Petros AM, Reed JC, Shen W, Tahir SK, Thompson CB, Tomaselli KJ, Wang B, Wendt MD, Zhang H, Fesik SW, Rosenberg SH (2005) An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 435: 677-681
83. Jansen B, Wachek V, Heere-Ress E, Schlagbauer-Wadl H, Hoeller C, Lucas T, Hoermann M, Hollenstein U, Wolff K, Pehamberger H (2000) Chemosensitisation of malignant melanoma by BCL2 antisense therapy. *Lancet* 356: 1728-1733
84. Zawilska JB, Wojcieszak J, Olejniczak AB (2013) Prodrugs: a challenge for the drug development. *Pharmacol Rep* 65 :1-14
85. McDermott SP, Eppert K, Notta F, Isaac M, Datti A, Al-Awar R, Wrona J, Minden MD, Dick JE (2012) A small molecule screening strategy with validation on human leukemia stem cells uncovers the therapeutic efficacy of kinetin riboside. *Blood* 119: 1200-1207

Biological activity of N⁶-furfuryladenosi- ne

Dariusz Wawrzyniak¹, Katarzyna Rolle^{1,2,✉}, Jan Barciszewski^{1,3,✉}

¹Department of Molecular Neurooncology, Institute of Bioorganic Chemistry of the Polish Academy of Sciences, Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznan, Poland

²Centre for Advanced Technology, Adam Mickiewicz University, Umultowska 89 C, 61-614 Poznan, Poland

³NanoBioMedical Centre, Adam Mickiewicz University, Umultowska 85, 61-614 Poznan, Poland

✉corresponding authors: kbug@ibch.poznan.pl (KR); Jan.Barciszewski@ibch.poznan.pl (JB)

ABSTRACT

Cytokinins are a group of plant hormones which play an important role in plant growth and development. They produce various effects when applied to intact plants. They particularly stimulate protein synthesis and participate in cell cycle control. First discovered cytokinin was N⁶-furfuryladenosi- ne (kinetin). It is a strong inhibitor of proteins and nucleic acids oxidation *in vitro* and *in vivo*. Both kinetin and its ribosides (N⁶-furfuryladenosi- ne, kinetin riboside) as natural compounds occur in the milk of coconuts on the nanomole level. Kinetin riboside selectively inhibits the proliferation of cancer cells and induce their apoptosis. This review focuses on the kinetin riboside occurrence, and primarily on its metabolism, and biological activity.