

## HASPINA I POTENCJALNE ZASTOSOWANIE JEJ INHIBITORÓW JAKO LEKÓW ANTYMITOTYCZNYCH

### HASPIN AND THE POTENTIAL USE OF ITS INHIBITORS AS ANTI-MITOTIC AGENTS

Natalia GLATZEL-PLUCIŃSKA, Christopher KOBIERZYCKI, Piotr DZIĘGIEL

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

*Streszczenie:* Obecnie w leczeniu chorób nowotworowych wykorzystywane są głównie leki antymitotyczne skierowane przeciwko mikrotubulom. Skutecznie hamują one podziały komórek nowotworowych, lecz odznaczają się wysoką toksycznością również wobec prawidłowych komórek organizmu. Stwarza to konieczność poszukiwania alternatywnych leków, skierowanych przeciwko innym niż tubulina białkom zaangażowanym w mitozę. Potencjalnym celem dla tego typu leków może być Haspina. Jest to kinaza zaangażowana w segregację chromosomów podczas podziałów komórkowych. Posiada tylko jeden znany substrat – treoninę 3 histonu H3 – i jest obecna we wszystkich proliferujących komórkach. Wiadomo, że w niektórych komórkach nowotworowych jej poziom jest wyjątkowo wysoki. Znanych jest wiele inhibitorów Haspiny, najpopularniejsze z nich to 5-jodotubercydyna i CHR-6494. Dowiedziono, że ich zastosowanie prowadzi do zaburzeń w przebiegu mitozy i może skutkować apoptozą. Efekt ten jest szczególnie wyraźny w przypadku komórek nowotworowych. Jeden z inhibitorów – CHR-6494 – został przetestowany *in vivo* na myszach z wszczepionymi ludzkimi komórkami nowotworu jelita grubego. U myszy leczonych inhibitorem nastąpiło zahamowanie wzrostu guza w porównaniu z grupą kontrolną. Nie zauważono przy tym żadnych oznak toksyczności testowanego środka. Nie wiadomo, z czego wynika wysoka wrażliwość komórek nowotworowych na działanie inhibitorów Haspiny i temat ten z pewnością wymaga dokładnego zbadania. Biorąc pod uwagę niewystarczającą skuteczność testowanych dotychczas leków skierowanych przeciwko kinazom mitotycznym, doniesienia na temat Haspiny wydają się obiecujące. W chwili obecnej nie są jednak prowadzone testy kliniczne żadnego leku skierowanego przeciwko Haspinie.

*Słowa kluczowe:* Haspina, mitoza, nowotwór, leki antymitotyczne

*Summary:* Nowadays, in the treatment of malignant neoplastic diseases mainly microtubule-targeted antimitotic agents are used. On the one hand, they effectively inhibit the division of cancer cells. On the other, they are characterized by high toxicity to normal cells. This creates a need to look for new antimitotic substances, directed against other than tubulin proteins involved in mitosis. A potential target for such drugs could be Haspin. Haspin is a kinase taking part in chromosome segregation

during cell division. It has only one known substrate – threonine 3 of histone H3 – and is present in all proliferating cells. It is known that in some types of cancer cells the level of Haspin is unusually high. There are several Haspin inhibitors. The most popular of them are 5-iodotubercidin and CHR-6494. It is proved that their use *in vitro* results in disruption of mitosis and may lead to apoptosis. These effects may be seen especially in cancer cells. One of these inhibitors – CHR-6494 – was tested *in vivo* in mice engrafted with human colon cancer cells. There was an inhibition of tumor growth in the mice treated with the inhibitor compared to the control group. No signs of toxicity of the tested agent was observed. It is not known why cancer cells are so sensitive to Haspin inhibitors and this issue should be investigated. Considering the insufficient effectiveness of drugs directed against mitotic kinases, reports about Haspin seem promising. So far, however, no clinical trials of drugs directed against Haspin were conducted.

*Key words:* Haspin, mitosis, cancer, antimitotic agents

## WSTĘP

Według danych udostępnionych przez Cancer Research UK i WHO w 2012 roku choroby nowotworowe zostały zdiagnozowane u 14,2 miliona osób na całym świecie i stały się przyczyną 8,1 miliona zgonów [36, 37]. Daje to niemal 40 tysięcy nowych zachorowań i ponad 22 tysiące zgonów każdego dnia. Szacuje się, że w 2014 roku w samych tylko Stanach Zjednoczonych choroba nowotworowa zostanie zdiagnozowana u 1,6 miliona osób, a około 600 tysięcy osób umrze z jej powodu [38]. Skala problemu stwarza konieczność poszukiwania nowych rozwiązań i skutecznych leków, zapewniających efektywną i jak najmniej uciążliwą dla pacjenta terapię.

Obecnie w leczeniu chorób nowotworowych najczęściej wykorzystywane są dwie grupy leków antymitotycznych: alkaloidy barwinka (np. winkrystyna, winblastyna) oraz taksany (np. paklitaksel, docetaksel) [18, 23, 34]. Wszystkie one oddziałują na mikrotubule – blokują ich polimeryzację (alkaloidy barwinka) lub też uniemożliwiają depolimeryzację (taksany) [23]. Zaburzenia dynamiki mikrotubul uniemożliwiają prawidłowe formowanie wrzeciona podziałowego, co z kolei hamuje podziały komórek nowotworowych i może inicjować ich apoptozę [4, 23, 25, 34]. Poważną wadą tego typu leków jest ich wysoka toksyczność. Szczególnie działają na dzielące się komórki hematopoetyczne szpiku kostnego [23], mają także negatywny wpływ na strukturę cytoszkieletu i zaburzają transport neuroprzekaźników w neuronach [4, 34]. W związku z tym nie ustają poszukiwania substancji mniej toksycznych dla prawidłowych komórek organizmu, skierowanych przeciwko innym niż tubulina białkom zaangażowanym w mitozę. Od dłuższego czasu prowadzone są testy kliniczne inhibitorów działających na kinazy zależne od cyklin, kinazy rodzin Plk i Aurora, a także kinezyzny mitotyczne [4, 23, 25, 34]. Substancje te nie wykazują jednak oczekiwanej aktywności w warunkach *in vivo* i jak dotąd żadna z nich nie została dopuszczona do terapii przeciwnowotworowej [23]. Uważa się, że białko będące przedmiotem inhibicji powinno

pełnić istotną rolę podczas mitozy, a jednocześnie wykazywać jak najmniejszą aktywność w nie dzielących się komórkach. Idąc tym tokiem rozumowania, jako potencjalny cel dla nowych terapii antynowotworowych można przedstawić stosunkowo mało znaną kinazę – Haspinę.

## HASPINA, JEJ BUDOWA, FUNKCJA I MECHANIZM DZIAŁANIA

Haspina to kinaza serynowo – treoninowa, biorąca udział w procesie segregacji chromosomów podczas podziałów komórkowych [7-9]. Jej jedynym znanym substratem jest treonina 3 histonu H3 (Thr-3 H3) [7-9]. Pierwsze doniesienia na temat Haspiny pochodzą z roku 1994 [28, 29] – od tego czasu poznano jej strukturę, funkcję i ogólny mechanizm działania, jednak dotyczących jej publikacji ukazało się niewiele. Bazy literaturowe NCBI zawierają jedynie 33 artykuły posiadające w tytule hasło „*Haspin*”.

Matrycowy RNA dla Haspiny został po raz pierwszy wyizolowany z komórek jąder myszy, stąd nazwa kodującego ją genu (ang. *Germ cell-specific gene 2*, *Gsg2*) [28, 29]. Angielska nazwa *Haspin* jest natomiast skrótem od *Haploid germ cell-specific kinase* [28, 29]. Gen *Gsg2* podlega silnej ekspresji w jądrach [27-29], początkowo uważano więc, że Haspina jest białkiem charakterystycznym dla komórek haploidalnych [28]. Obecnie wiadomo, że występuje też w proliferujących komórkach diploidalnych, łącznie z nowotworowymi [14]. Jej transkrypty wykrywane są w ludzkiej grasicy i szpiku kostnym, a także, w mniejszych ilościach, w prostaty, jelitach, płucach, śledzionie, węzłach chłonnych i tkankach płodowych [14]. Gen *Gsg2* znajduje się pod kontrolą epigenetyczną – aktywność jego promotora regulowana jest przez metylację odpowiednich regionów DNA [26]. W komórkach spermatogenetycznych są one hipometylowane, co skutkuje wysoką ekspresją *Gsg2*, natomiast w komórkach somatycznych hipermetylowane, co zmniejsza aktywność promotora o 60-80% [26].

Haspina zbudowana jest z dwóch domen – mniejszej N-końcowej (regulatorej) i większej C-końcowej (katalitycznej), połączonych regionem zawiasowym – wykazuje charakterystyczną dwupłatową budowę typową dla eukariotycznych kinaz białkowych [2, 11, 15, 30] (ryc. 1). Liczne modyfikacje, głównie w obrębie domeny katalitycznej, nie pozwalają jednak na przyporządkowanie jej do żadnej ze znanych podrodzin [15]. Analiza filogenetyczna wykazała, że ortologi Haspiny pochodzące z różnych organizmów eukariotycznych tworzą odrębną rodzinę kinaz białkowych, konserwatywną pod względem budowy domeny C-końcowej, lecz wykazującą znaczną dywergencję w budowie domeny N-końcowej [15].

Haspina jest białkiem jądrowym, podczas mitozy związanym z chromosomami [7, 16]. Występuje na całej długości chromosomu, lecz wyraźnie skupia się w okolicach centromeru [7]. Po zaniku otoczki jądrowej w trakcie podziału



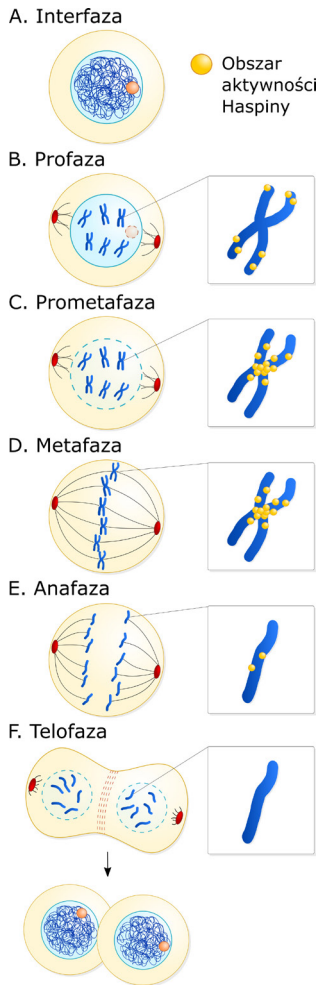
**RYCINA 1.** Struktura trzeciorzędowa domeny kinazowej Haspiny. Rysunek stworzony z wykorzystaniem oprogramowania Polyview3D na podstawie modelu 2VUW z bazy danych Protein Data Bank [11, 41]. Kolorem niebieskim oznaczony jest N-koniec, kolorem czerwonym – C-koniec białka  
**FIGURE 1.** The tertiary structure of the kinase domain of Haspin. The picture was created using Polyview3D software basing on the model 2VUW from Protein Data Bank [11, 41]. The N-terminus is colored in blue, the C-terminus – in red

komórki przemieszcza się również do centrosomów, a w czasie metafazy – do mikrotubul wrzeciona podziałowego [9]. Fosforylacja Thr-3 H3 przez Haspinę rozpoczyna się we wczesnej profazie na ramionach chromosomu, z dala od centromeru [16]. Stopniowo fosforylowane są treoniny znajdujące się coraz bliżej centromeru, a w późnej profazie fosforylacja zachodzi najintensywniej w jego rejonie [16]. Fosforylacja ta utrzymuje się podczas prometafazy i metafazy, zanika w trakcie anafazy, a w telofazie jest niewykrywalna [7, 9, 16] (ryc. 2).

Fosforylacja Thr-3 H3 jest niezbędna do związania z chromatyną kompleksu białkowego CPC (ang. *Chromosomal Passenger Complex*) [8, 32]. Wchodząca w jego skład kinaza Aurora B odpowiada między innymi za kontrolę przyłączania mikrotubul wrzeciona podziałowego do kinetochorów [32]. Jeśli kinetochory chromatyd siostrzanych zostały niepoprawnie przyłączone do wrzeciona, brak napięcia pomiędzy nimi powoduje destabilizację wiązania przez Aurorę B [13, 21]. Umożliwia to ponowne, poprawne przyłączenie mikrotubul [13, 21]. Połączenie

to jest monitorowane przez SAC (ang. *Spindle Assembly Checkpoint*), kompleks białkowy, który reguluje przejście do anafazy [13, 20, 21]. Gdy chromosomy zorientowane są prawidłowo, SAC aktywuje APC (ang. *Anaphase Promoting Complex*), co prowadzi do degradacji kohezyn łączących siostrzane chromatydy [20]. Rozchodzą się one do przeciwnych biegunów komórki i podział jest kontynuowany [20]. Podsumowując, aktywność Haspiny jest konieczna dla prawidłowego przyłączenia chromosomów do wrzeciona podziałowego i ich równomiernego podziału do komórek potomnych.

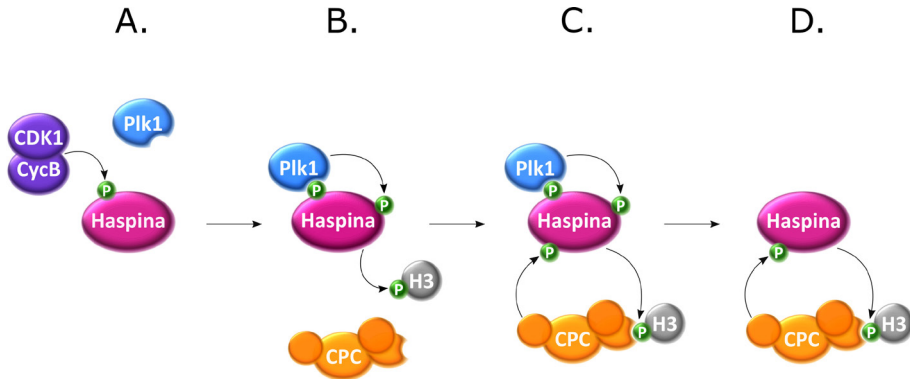
Haspina jest konstytutywnie aktywna, jednak podczas interfazy podlega autoinhibicji [12]. Za przywrócenie jej aktywności wraz z rozpoczęciem fazy M cyklu komórkowego odpowiada kompleks CDK1-CycB (ang. *Cyclin-Dependent Kinase*



**RYCINA 2.** Mitoza. Regiony, w których aktywna jest Haspina, zostały oznaczone żółtymi kropkami [7, 9, 16].

**A.** Interfaza. Trwa replikacja DNA, komórka przygotowuje się do podziału mitotycznego. **B.** Profaza. Następuje kondensacja chromatyny i formowane są chromosomy, zanika jąderko. Haspina jest aktywna i fosforyluje Thr-3 H3 na ramionach chromosomów. **C.** Prometafaza. Zanika otoczka jądrowa. Aktywność Haspiny skupia się w rejonie centromerów. **D.** Metafaza. Chromosomy formują płytkę metafazalną, mikrotubule wrzeciona podziałowego przyłączone są do centromerów. Haspina jest w dalszym ciągu aktywna w rejonie centromerów. **E.** Anafaza. Chromatydy każdego z chromosomów oddzielają się od siebie i są odciągane w kierunku biegunów komórki. Fosforylacja Thr-3 H3 zanika. **F.** Telofaza. Następuje odtworzenie otoczki jądrowej i cytokineza. Fosforylacja Thr-3 H3 jest niewykrywalna

**FIGURE 2.** Mitosis. The regions of the chromosomes, where Haspin is active, are marked with yellow dots [7, 9, 16]. **A.** Interphase. DNA is replicated, cell prepares to mitosis. **B.** Prophase. Chromatin condenses to form the chromosomes. The nucleolus disappears. Haspin is active and phosphorylates Thr-3 H3 on the arms of the chromosomes. **C.** Prometaphase. The nuclear membrane breaks apart. Haspin is active mainly in the region of the centromere. **D.** Metaphase. The chromosomes align on the equator and attach to the spindle. Haspin is still active in the region of the centromere. **E.** Anaphase. Chromosomes separate into sister chromatids and move to opposite ends of the spindle. The phosphorylation of Thr-3 H3 disappears. **F.** Telophase. Nuclear membranes form around each of the two sets of chromosomes. Cytokinesis begins. The phosphorylation of Thr-3 H3 is undetectable



**RYCINA 3.** Aktywacja Haspiny i jej późniejsze oddziaływanie z kompleksem CPC [12, 35]. **A.** Fosforylacja N-końca Haspiny przez kompleks CDK1-CycB na początku profazy tworzy miejsce wiązania dla kinazy Plk1. **B.** Podczas profazy Plk1 fosforyluje Haspinę, powodując zniesienie jej autoinhibicji. Aktywna Haspina fosforyluje Thr-3 H3 na ramionach chromosomów. Stopniowo miejsca fosforylacji przesuwiają się w stronę centromeru. **C.** Do fosforylowanej Thr-3 H3 przyłącza się kompleks CPC. Aurora B, jedno z białek tworzących CPC, fosforyluje Haspinę, powodując wzrost jej aktywności. **D.** Podczas prometafazy i metafazy dodatnie sprzężenie zwrotne Haspina-CPC prowadzi do akumulacji CPC w rejonie centromeru

**FIGURE 3.** Activation of Haspin and its further interactions with the chromosomal passenger complex – CPC [12, 35]. **A.** The N-terminus of Haspin is phosphorylated by the CDK1-CycB complex in early prophase. It provides a binding site for Plk1 kinase. **B.** During prophase Haspin is activated by phosphorylation by Plk1. After the activation, Haspin phosphorylates Thr-3 H3 on the arms of the chromosomes. Locations where the phosphorylation takes place gradually move toward the centromeres. **C.** CPC attaches to the phosphorylated Thr-3 H3. Aurora B kinase (one of the CPC components) phosphorylates Haspin, causing an increase in its activity. **D.** During prometaphase and metaphase the positive Haspin-CPC feedback loop promotes CPC accumulation in the region of the centromere

*I-Cyclin B*) oraz kinaza Plk1 (ang. *Polo-like kinase 1*) [12, 35]. Fosforylacja Haspiny przez CDK1-CycB tworzy miejsce wiązania dla kinazy Plk1, która poprzez dalszą fosforylację prowadzi do aktywacji Haspiny [12, 35]. Proces ten zachodzi podczas profazy, Haspina jest wtedy aktywna głównie na ramionach chromosomów [35]. Aktywacja Haspiny w okolicach centromeru jest powodowana fosforylacją przez kinazę Aurora B, wchodzącą w skład kompleksu CPC [35]. W rejonie centromeru dochodzi do dodatkowego sprzężenia zwrotnego – Haspina fosforyluje histon H3, tworząc miejsce wiązania dla CPC, Aurora B natomiast fosforyluje Haspinę, zwiększając jej aktywność [12, 19, 33, 35] (ryc. 3).

## ROLA HASPINY W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH

Niewiele wiadomo na temat roli Haspiny w przebiegu procesu onkogenezy. Udowodniono, że gen *Gsg2* jest nadekspresjonowany w komórkach chłoniaka Burkitta pochodzących z próbek pobranych od pacjentów [10], a także z hodow-

li komórkowej (linie Ramos B [14] i Daudi [39]). Jego transkrypty są obecne w dużych ilościach również w hodowlach innych nowotworów wywodzących się z komórek limfoidalnych (Jurkat T [14], Karpas-707, MOLT-4, REH [39]). W mniejszych ilościach są wykrywane w hodowlach komórek nowotworów płuc (H69 [14], A-549 [39]) i mózgu (SK-N-SH [14], U-251 MG [39]). Dlaczego *Gsg2* jest ekspresjonowany tak intensywnie właśnie w komórkach chłoniaka Burkitta? Być może jest to powiązane z bardzo szybkim tempem wzrostu tego nowotworu – charakteryzuje się krótkim czasem podwojenia masy guza [31]. Brakuje jednak bardziej szczegółowych danych, pozwalających powiązać ekspresję *Gsg2* w komórkach danej linii ze stopniem ich proliferacji. W bazie danych The Human Protein Atlas Project [39] można znaleźć informacje na temat poziomu Haspiny w tkankach nowotworowych pobranych od pacjentów. Z wykorzystaniem metod immunohistochemicznych stwierdzono, że jest ona obecna we wszystkich przebadanych nowotworach skóry, w większości nowotworów jajnika oraz w połowie przypadków nowotworów gruczołu piersiowego i przewodu pokarmowego [39]. Informacje te dotyczą jednak niewielkiej ilości przypadków (10-12 przebadanych próbek dla każdej grupy nowotworów), trudno je więc uznać za reprezentatywne.

Z danych eksperymentalnych wynika, że komórki nowotworowe są wrażliwe na wszelkie zaburzenia poziomu Haspiny. Zwiększenie jej ilości w komórkach HeLa (rak szyjki macicy) z wykorzystaniem wektorów ekspresyjnych prowadzi do obniżenia proliferacji tych komórek o około 60% w porównaniu z grupą kontrolną [9]. Stan ten powoduje również zaburzenia kinetyki cyklu komórkowego – opóźnienia w przejściu do anafazy i akumulację komórek znajdujących się w profazie i prometafazie [9]. Supresja genu *Gsg2* za pomocą siRNA skutkuje natomiast zmniejszeniem stopnia fosforylacji Thr-3 H3 w komórkach HeLa i U2OS (kostniakomięsak) [9]. Prowadzi to do zaburzeń w strukturze wrzeciona podziałowego, ułożeniu chromosomów i formowaniu płytki metafazalnej, a w konsekwencji do zatrzymania komórek w prometafazie [9]. Zaburzenia te są tym wyraźniejsze, im niższy od normalnego jest poziom fosforylacji Thr-3 H3 [9]. Doniesienia te pozwalają przypuszczać, że substancje powodujące deregulację poziomu lub aktywności Haspiny w komórce mogą mieć działanie antymitotyczne.

## INHIBITORY HASPINY JAKO POTENCJALNE LEKI ANTYMITOTYCZNE

Pierwsze próby znalezienia niskocząsteczkowego inhibitora Haspiny opisano w roku 2008. Z wykorzystaniem techniki TR-FRET przetestowano wówczas 140 000 różnych związków chemicznych [24]. Po dalszych badaniach, mających na celu ustalenie aktywności wstępnie wyselekcjonowanych cząsteczek w hodowli komórkowej oraz ich wpływu na inne kinazy, zidentyfikowano 5 substancji, mogących mieć przyszłe zastosowanie jako inhibitory Haspiny w badaniach klinicz-

nych [24]. Najbardziej obiecującą z nich była pochodna akrydyny LDN-192960 ( $IC_{50} = 0,01 \mu\text{M}$ ) [5,24]. Późniejsze badania doprowadziły do odkrycia dwóch kolejnych, nieco słabszych inhibitorów: harminy ( $IC_{50} = 0,59 \mu\text{M}$ ) i harmolu ( $IC_{50} = 0,77 \mu\text{M}$ ) [6]. Wadą zarówno LDN-192960, jak też harminy i harmolu, jest działanie hamujące również na kinazę DYRK2 [6] (ang. *Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated Kinase 2* – jedna z kinaz biorących udział w regulacji cyklu komórkowego i procesów proliferacji) [3].

Innym opisanym inhibitorem Haspiny jest 5-jodotubercydyna (5-ITu) [1,11]. Działanie 5-ITu w stężeniach  $0,1 - 0,5 \mu\text{M}$  na komórki HeLa powoduje znaczny spadek fosforylacji Th-3 H3, a przy stężeniu inhibitora równym  $10 \mu\text{M}$  – całkowity jej zanik [1]. Efektem tego jest niepoprawna lokalizacja CPC podczas mitozy – jest on wykrywany nie w okolicy centromeru, lecz przy ramionach chromosomów, a komórki wykazują zależne od stężenia inhibitora zaburzenia formowania płytki metafazowej [1]. Wadą tego inhibitora może być fakt, że działa również na inne kinazy (między innymi rodzin CLK (ang. *CDC-Like Kinases*) i DYRK (ang. *Dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated Kinases*)) [1]. Dowiedziono, że inhibicja Haspiny z zastosowaniem 5-ITu prowadzi do zmiany poziomu ufosforylowania ponad 300 białek zaangażowanych w mitozę, obróbkę RNA i modyfikacje histonów i chromatyny [22]. Może to wskazywać na istnienie innych niż Thr-3 H3 substratów Haspiny.

Pierwszym z inhibitorów Haspiny przetestowanym *in vivo* jest CHR-6494 [17]. Jego podawanie myszom z wszczepionymi komórkami HCT-116 (ludzki nowotwór jelita) powodowało zahamowanie wzrostu guza, które ustawało po zaprzestaniu podawania inhibitora [17]. Nie zaobserwowano żadnych oznak toksyczności testowanego środka [17]. Upřednio przeprowadzono badania *in vitro* na komórkach nowotworowych HeLa, HCT-116 i MDA-MB-231 (nowotwór piersi) oraz prawidłowych, nie proliferujących komórkach embrionalnych Wi38 (płuco). Dowiedziono, że CHR-6494 hamuje fosforylację treoniny 3 histonu H3 w stopniu zależnym od stężenia, nie wpływając przy tym na stężenie Haspiny w komórce [17]. Testy żywotności wykazały zahamowanie wzrostu komórek, również zależne od stężenia CHR-6494 [17]. Wartość  $IC_{50}$  dla komórek nowotworowych mieściły się w zakresie  $0,47 - 0,75 \mu\text{M}$ , dla komórek prawidłowych były natomiast dwukrotnie wyższe ( $IC_{50} = 1,06 \mu\text{M}$ ) [17]. Zahamowanie proliferacji było powiązane z zatrzymaniem mitozy w fazie  $G_2/M$  i apoptozą [17]. W traktowanych inhibitorem komórkach można było zauważyć nieprawidłową strukturę wrzeciona podziałowego i zaburzenia w ułożeniu oraz strukturze chromosomów, co mogło być spowodowane defektami w duplikacji centrosomów [17].



## PODSUMOWANIE

Biorąc pod uwagę fakt, że poszukiwania nowych celów dla terapii antymitotycznych nie przyniosły jak dotąd zadowalających rezultatów, doniesienia dotyczące Haspiny wydają się obiecujące. Haspina obecna jest wyłącznie w komórkach proliferujących [14] i podlega nadekspresji w niektórych typach nowotworów [10, 14, 39]. Jest kodowana przez jeden gen, nie posiada izoform i różni się znacznie od innych kinaz białkowych [2, 11, 15, 30]. Jest przy tym czynnie zaangażowana w proces podziałów komórkowych [7-9]. Wyciszenie ekspresji kodującego ją genu *Gsg2* z wykorzystaniem siRNA, a także użycie jej niskocząsteczkowych inhibitorów prowadzi do zaburzeń w formowaniu płytki metafazowej i do tworzenia nieprawidłowych połączeń mikrotubul wrzeczona podziałowego z kinetochorami [5, 6, 17, 24]. Powoduje to zatrzymanie mitozy i może prowadzić do apoptozy [5, 6, 17, 24]. Testy *in vivo* na myszach dowiodły, że inhibicja Haspiny hamuje wzrost guzów nowotworowych, nie powodując przy tym skutków niekorzystnych dla zwierzęcia [17].

Nie ulega wątpliwości, że określenie dokładnej roli Haspiny w chorobach nowotworowych wymaga dalszych, intensywnych badań. Szczególnie interesująca wydaje się możliwość istnienia korelacji pomiędzy stopniem proliferacji nowotworu a stężeniem Haspiny w komórce. Wysoka ekspresja genu *Gsg2* w chłoniaku Burkitta stwarza pytanie, jaka byłaby jego reakcja na terapię inhibitorem Haspiny. Leczenie tego nowotworu stanowi szczególne wyzwanie, gdyż wymaga wysokodawkowej chemioterapii systemowej, zdolnej do przeniknięcia bariery krew – mózg [10]. Nowy, skuteczny lek o niskiej toksyczności dla nie dzielących się komórek byłby wybawieniem dla cierpiących na ten nowotwór chorych.

Z drugiej strony, uważa się obecnie, że skuteczność konwencjonalnych leków skierowanych przeciwko mikrotubulom powodowana jest właśnie ich toksycznością nie tylko dla komórek, które w danej chwili podlegają podziałowi, ale również dla tych znajdujących się w interfazie [23]. Powodem niezadowalającej skuteczności nowoczesnych inhibitorów białek mitotycznych może więc być fakt, że działają one tylko na komórki znajdujące się w fazie M, pozwalając przetrwać komórkom nowotworowym, które w momencie zastosowania leku się nie dzielą. Czy inhibitory Haspiny wykażą się lepszym działaniem w warunkach *in vivo* niż leki skierowane przeciwko kinazom rodzin Aurora czy Plk? W tej chwili odpowiedź na to pytanie nie jest jeszcze możliwa. Według strony internetowej [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), stanowiącej bazę danych o testach klinicznych prowadzonych na całym świecie, nie są obecnie prowadzone testy żadnego leku skierowanego przeciwko Haspinie [40].

## LITERATURA

- [1] DE ANTONI A, MAFFINI S, KNAPP S, MUSACCHIO A, SANTAGUIDA S. A small-molecule inhibitor of Haspin alters the kinetochore functions of Aurora B. *J Cell Biol* 2012; **199**: 269-284.
- [2] BAYLISS R, FRY A, HAQ T, YEOH S. On the molecular mechanisms of mitotic kinase activation. *Open Biol* 2012; **2**.
- [3] BECKER W. Emerging role of DYRK family protein kinases as regulators of protein stability in cell cycle control. *Cell Cycle* 2012; **11**: 3389-3394.
- [4] CHAN K-S, KOH C-G, LI H-Y. Mitosis-targeted anti-cancer therapies: where they stand. *Cell Death Dis* 2012; **3**.
- [5] CUNY GD, ROBIN M, ULYANOVA NP, PATNAIK D, PIQUE V, CASANO G, LIU J-F, LIN X, XIAN J, GLICKSMAN MA, STEIN RL, HIGGINS JMG. Structure-activity relationship study of acridine analogs as haspin and DYRK2 kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2010; **20**: 3491-3494.
- [6] CUNY GD, ULYANOVA NP, PATNAIK D, LIU J-F, LIN X, AUERBACH K, RAY SS, XIAN J, GLICKSMAN MA, STEIN RL, HIGGINS JMG. Structure-activity relationship study of beta-carboline derivatives as haspin kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2012; **22**: 2015-2019.
- [7] DAI J, HIGGINS JMG. Haspin: A Mitotic Histone Kinase Required for Metaphase Chromosome Alignment. *Cell Cycle* 2005; **4**: 665-668.
- [8] DAI J, KATENEVA AV, HIGGINS JMG. Studies of haspin-depleted cells reveal that spindle-pole integrity in mitosis requires chromosome cohesion. *J Cell Sci* 2009; **122**: 4168-4176.
- [9] DAI J, SULTAN S, TAYLOR SS, HIGGINS JMG. The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment. *Genes Dev* 2005; **19**: 472-488.
- [10] DAVE S, FU K, WRIGHT G, LAM L, KLUIN P, BOERMA B-J, GREINER T, WEISENBURGER D, ROSENWALD A, OTT G, MULLER-HERMELINK H-K. Molecular Diagnosis of Burkitt's Lymphoma. *N Engl J Med* 2006: 2431-2442.
- [11] ESWARAN J, PATNAIK D, FILIPPAKOPOULOS P, WANG F, STEIN RL, MURRAY JW, HIGGINS JMG, KNAPP S. Structure and functional characterization of the atypical human kinase haspin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**: 20198-20203.
- [12] GHENOIU C, WHELOCK MS, FUNABIKI H. Autoinhibition and Polo-dependent multisite phosphorylation restrict activity of the histone H3 kinase Haspin to mitosis. *Mol Cell* 2013; **52**: 997-1003.
- [13] HAUF S, COLE RW, LATERRA S, ZIMMER C, SCHNAPP G, WALTER R, HECKEL A, VAN MEEL J, RIEDER CL, PETERS J-M. The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol* 2003; **161**: 281-294.
- [14] HIGGINS JMG. The Haspin gene: location in an intron of the Integrin  $\alpha E$  gene, associated transcription of an Integrin  $\alpha E$ -derived RNA and expression in diploid as well as haploid cells. *Gene* 2001; **267**: 55-69.
- [15] HIGGINS JMG. Haspin-like proteins: A new family of evolutionarily conserved putative eukaryotic protein kinases. *Protein Sci* 2001; **10**: 1677-1684.
- [16] HIGGINS JMG. Haspin: a newly discovered regulator of mitotic chromosome behavior. *Chromosoma* 2010; **119**: 137-147.
- [17] HUERTAS D, SOLER M, MORETO J, VILLANUEVA A, MARTINEZ A, VIDAL A, CHARLTON M, MOFFAT D, PATEL S, McDERMOTT J, OWEN J, BROTHERTON D, ET AL. Antitumor activity of a small-molecule inhibitor of the histone kinase Haspin. *Oncogene* 2012; **31**: 1408-1418.
- [18] JACKSON JR, PATRICK DR, DAR MM, HUANG PS. Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulin agents? *Nat Rev Cancer* 2007; **7**: 107-117.
- [19] KELLY AE, GHENOIU C, XUE JZ, ZIERHUT C, KIMURA H, FUNABIKI H. Survivin reads phosphorylated histone H3 threonine 3 to activate the mitotic kinase Aurora B. *Science* 2010; **330**: 235-239.
- [20] LARA-GONZALEZ P, WESTHORPE FG, TAYLOR SS. The spindle assembly checkpoint. *Curr Biol* 2012; **22**: 966-980.
- [21] LEBRASSEUR N. Aurora B puts chromosomes in their place. *J Cell Biol* 2003; **161**: 218-218.
- [22] MAIOLICA A, DE MEDINA REDONDO M, SCHOOF EM, CHAIKUAD A, VILLA F, GATTI M, JEGANATHAN S, LOU HJ, NOVY K, HAURI S, TOPRAK UH, HERZOG F, ET AL. Modulation of the chromatin phosphoproteome by the haspin protein kinase. *Mol Cell Proteomics* 2014; **13**: 1724-1740.

- [23] MARZO I, NAVAL J. Antimitotic drugs in cancer chemotherapy: promises and pitfalls. *Biochem Pharmacol* 2013; **86**: 703-710.
- [24] PATNAIK D, XIAN J, GLICKSMAN MA, CUNY GD, STEIN RL, HIGGINS JMG. Identification of Small Molecule Inhibitors of the Mitotic Kinase Haspin by High Throughput Screening using a Homogeneous Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer Assay. *J Biomol Screen* 2008; **13**: 1025-1034.
- [25] PÉREZ DE CASTRO I, DE CÁRCER G, MONTOYA G, MALUMBRES M. Emerging cancer therapeutic opportunities by inhibiting mitotic kinases. *Curr Opin Pharmacol* 2008; **8**: 375-383.
- [26] SATO S, MAEDA C, HATTORI N, YAGI S, TANAKA S. DNA Methylation-dependent Modulator of Gsg2/Haspin Gene. *J Reprod Dev* 2011; **57**.
- [27] TANAKA H, IGUCHI N, NAKAMURA Y, KOHROKI J, DE CARVALHO CE, NISHIMUNE Y. Cloning and characterization of human haspin gene encoding haploid germ cell-specific nuclear protein kinase. *Mol Hum Reprod* 2001; **7**: 211-218.
- [28] TANAKA H, YOSHIMURA Y, NISHINA Y, NOZAKI M, NOJIMA H, NISHIMUNE Y. Isolation and characterization of cDNA clones specifically expressed in testicular germ cells. *FEBS Lett* 1994; **355**: 4-10.
- [29] TANAKA H, YOSHIMURA Y, NOZAKI M, YOMOGIDA K, TSUCHIDA J, TOSAKA Y, HABU T, NAKANISHI T, OKADA M, NOJIMA H, NISHIMUNE Y. Identification and characterization of a haploid germ cell-specific nuclear protein kinase (Haspin) in spermatid nuclei and its effects on somatic cells. *J Biol Chem* 1999; **274**: 17049-17057.
- [30] VILLA F, CAPASSO P, TORTORICI M, FORNERIS F, DE MARCO A, MATTEVI A, MUSACCHIO A. Crystal structure of the catalytic domain of Haspin, an atypical kinase implicated in chromatin organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**: 20204-20209.
- [31] WALEWSKI J. Chłoniak Burkitta. Zasadę postępowania diagnostycznego – terapeutycznego w nowotworach złośliwych. Tom II. VM Media sp. z o. o.; 2013: 916-925.
- [32] WANG F, DAI J, DAUM JR, NIEDZIALKOWSKA E, BANERJEE B, STUKENBERG PT, GORBSKY GJ, HIGGINS JMG. Histone H3 Thr-3 phosphorylation by Haspin positions Aurora B at centromeres in mitosis. *Science* 2010; **330**: 231-235.
- [33] WANG F, ULYANOVA NP, VAN DER WAAL MS, PATNAIK D, LENS SMA, HIGGINS JMG. A Positive Feedback Loop Involving Haspin and Aurora B Promotes CPC Accumulation at Centromeres in Mitosis. *Curr Biol* 2011; **21**: 1061-1069.
- [34] WOOD KW, CORNWELL WD, JACKSON JR. Past and future of the mitotic spindle as an oncology target. *Curr Opin Pharmacol* 2001; **1**: 370-377.
- [35] ZHOU L, TIAN X, ZHU C, WANG F, HIGGINS JMG. Polo-like kinase-1 triggers histone phosphorylation by Haspin in mitosis. *EMBO Rep* 2014; **15**: 273-81.
- [36] WHO|World Health Organization. <http://www.who.int/en/>. Accessed 12 October 2014.
- [37] Cancer Research UK. <http://www.cancerresearchuk.org/>. Accessed 12 October 2014.
- [38] American Cancer Society|Information and Resources for Cancer: Breast, Colon, Lung, Prostate, Skin. <http://www.cancer.org/>. Accessed 12 October 2014.
- [39] The Human Protein Atlas Project. [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org). Accessed 15 July 2015.
- [40] Clinical Trials. [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov). Accessed 30 December 2014.
- [41] RCSB Protein Data Bank. [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org). Accessed 28 July 2015.

*Redaktor prowadzący – Michał Nowicki*

*Otrzymano: 19.08.2015*

*Przyjęto: 27.10.2015*

*Natalia Glatzel-Plucińska*

*ul. Chalubińskiego 6a, 50-368 Wrocław*

*e-mail: n.m.glatzel@gmail.com*

*tel. 71 784 15 49*

*fax: 71 748 00 82*

