

## Streszczenie pracy doktorskiej

**Tytuł:** Niskocząsteczkowe inhibitory oddziaływania białek p53-Mdm2/MdmX jako podstawa strategii terapii przeciwnowotworowej. Wyznaczenie struktury krystalograficznej domeny FAS1 receptora kwasu hialuronowego Stab2.

**Autor:** mgr inż. Aleksandra Twarda-Cłapa

**Promotor:** prof. dr Tadeusz Holak, **Promotor pomocniczy:** dr hab. Grzegorz Dubin

Choroby nowotworowe stanowią obecnie, obok chorób serca, główną przyczynę śmierci. Według Światowej Organizacji Zdrowia, nowotwory odpowiedzialne były za 8.8 milionów zgonów w 2015 roku, a wzrost liczby nowych przypadków szacowany jest na 70% w ciągu najbliższych dwóch dekad. Efektywne terapie, zazwyczaj kosztowne i obciążone poważnymi skutkami ubocznymi, dostępne są jedynie dla niektórych rodzajów nowotworów, dlatego też istnieje duża potrzeba lepszego poznania mechanizmów powstawania, rozwoju i przerzutowania nowotworów oraz poszukiwania nowych terapii.

Jednym z kluczowych białek niezbędnych dla obrony komórki przed wejściem na drogę nowotworzenia jest supresor nowotworowy p53 kodowany przez gen supresorowy *TP53*. Ten czynnik transkrypcyjny, zwany również „strażnikiem genomu”, wywołuje ekspresję genów odpowiedzialnych m. in. za zatrzymanie cyklu komórkowego, naprawę DNA i apoptozę w odpowiedzi na sygnały stresu komórkowego takie jak uszkodzenia DNA. Aktywność p53 jest hamowana w niemal wszystkich ludzkich nowotworach na drodze mutacji w genie *TP53* lub przez nadekspresję jego negatywnych regulatorów, białek Mdm2 i MdmX. W przypadkach nowotworów z niezmutowanym p53 pokazano, że uwolnienie go spod inhibicji białek regulatorowych przy pomocy niskocząsteczkowych antagonistów oddziaływania p53-Mdm2/MdmX stanowi istotną strategię uniwersalnej, niegenotoksycznej terapii przeciwnowotworowej.

Niedawne badania pozwoliły na identyfikację potencjalnej roli stabiliny-2 (Stab2), receptora kwasu hialuronowego, w procesie metastazy nowotworów. Stab2 należy do grupy receptorów zmiatających i uczestniczy w usuwaniu z krwioobiegu kilkunastu ligandów, między innymi kwasu hialuronowego. Badania *in vivo* na myszach wykazały, że zarówno brak Stab2, jak i zablokowanie tego receptora przy użyciu przeciwciał efektywnie zwiększa poziom kwasu hialuronowego we krwi, czemu towarzyszy zmniejszenie ilości przerzutów. Obecna wiedza na temat sposobów rozpoznawania i wiązania ligandów oraz mechanizmów

transdukcji sygnału przez Stab2 jest jednak ograniczona, a struktura przestrzenna żadnego z fragmentów Stab2 nie została jeszcze poznana.

Celem pracy doktorskiej było znalezienie niskocząsteczkowych związków będących inhibitorami oddziaływania białek p53-Mdm2/MdmX i scharakteryzowanie ich aktywności biologicznej oraz wyznaczenie struktury krystalicznej fragmentów receptora kwasu hialuronowego Stab2.

W niniejszej pracy wyselekcjonowano niskocząsteczkowe inhibitory białek Mdm2/MdmX oparte na kilku różnych ugrupowaniach centralnych: imidazolach, 2-furanonach, 3-pirolin-2-onach,  $\alpha$ -aminoacylamidach, tetrazolach, bisindolach,  $\beta$ -laktamach lub makrocyklach. Przy pomocy kilku metod biochemicznych: polaryzacji fluorescencji, termoforezy oraz spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego wyznaczono stałe wiązania związków do Mdm2/MdmX celem wyodrębnienia najsilniej wiążących inhibitorów. Dla tej grupy podjęto próby krystalizacji z białkiem Mdm2 oraz zbadano wpływ na zahamowanie wzrostu i zatrzymanie cyklu komórkowego w testach na liniach komórkowych. W rezultacie rozwiązano cztery struktury krystaliczne Mdm2 z inhibitorami z grupy pochodnych imidazoli, 2-furanonów i 3-pirolin-2-onów, które ukazały ciekawą, niespotykaną dotąd dimeryzację Mdm2. Potwierdzono również metodami spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego tworzenie się dimeru Mdm2 nie tylko w strukturze krystalicznej, ale również w roztworze. Co więcej, jeden ze związków z grupy pochodnych imidazoli wykazał silny wpływ na zahamowanie wzrostu i zatrzymanie cyklu komórkowego w komórkach nowotworowych *in vitro*. Związek ten zawiera ponadto alifatyczny linker, który może być użyty do sprzęgania z nośnikami biologicznymi takimi jak kwas hialuronowy w celu polepszenia właściwości farmakokinetycznych potencjalnego leku. Kolejnym istotnym wynikiem pracy doktorskiej było wyznaczenie wysokorozdzielczej (1.48 Å) struktury krystalicznej domeny FAS1 receptora kwasu hialuronowego Stab2, dla którego struktury przestrzenne żadnego z fragmentów nie zostały dotąd poznane.

Wyniki zostały przedyskutowane w kontekście danych literaturowych dotyczących białek Mdm2, MdmX, p53 i Stab2 zaangażowanych w proces progresji nowotworów. Przedstawiona praca doktorska przyczyniła się do poszerzenia wiedzy na temat zahamowania oddziaływania białek p53-Mdm2/MdmX przy pomocy niskocząsteczkowych antagonistów jako strategii przeciwnowotworowej oraz dostarczyła pionierskiej informacji strukturalnej na temat fragmentu receptora kwasu hialuronowego Stab2.