

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Aktywność biologiczna kowalencyjnych dimerów ludzkiego czynnika wzrostu fibroblastów 2 (FGF2)

Czynnik wzrostu fibroblastów 2 (ang. *fibroblast growth factor 2*, FGF2) jest jednym z najlepiej poznanych przedstawicieli rodziny białek FGF. Białko to odgrywa ważną rolę w proliferacji, migracji i różnicowaniu komórek, a także w procesach, takich jak angiogeneza i gojenie ran. Sygnał przekazywany przez FGF2 do komórek zachodzi poprzez oddziaływanie ze specyficznymi receptorami transbłonowymi o aktywności kinazy tyrozynowej (receptory czynnika wzrostu fibroblastów 1-4, ang. *fibroblast growth factor receptors*, FGFR1-4) oraz heparyną lub proteoglikanami. Jego funkcje efektorowe są wywoływane przez powstanie dimerycznego kompleksu 2:2:2 FGF2-FGFR1-heparyna.

W celu optymalizacji aktywacji receptora, a tym samym poprawy właściwości biologicznych FGF2, opracowałam kowalencyjne dimeryczne formy FGF2. Mutacje FGF2 typu dzikiego zostały zaprojektowane w celu uzyskania wariantów z pojedynczą reaktywną cysteiną eksponowaną na powierzchni białka do chemicznej koniugacji poprzez reakcję maleimidowo-tiolową z bis-funkcjonalizowanymi liniowymi łącznikami PEGowymi. Opracowałam osiem wariantów dimerycznego FGF2 o określonej topologii, różniących się wzajemną orientacją poszczególnych molekuł FGF2. Zaprojektowane białka pozostały funkcjonalne pod względem aktywacji FGFR, a następnie kolejnych cząsteczek sygnałowych szlaku ERK1/2. Ponadto charakteryzowały się one zwiększoną stabilnością, potencjałem mitogennym i aktywnością antyapoptotyczną, a także efektywniej indukowały odpowiedzi migracyjne w normalnych fibroblastach, w porównaniu z monomerem FGF2. Aktywność biologiczna dimerów była znacznie mniej zależna od heparyny. Co więcej, niektóre dimeryczne warianty FGF2 internalizowały się wydajniej w komórkach nowotworowych z nadekspresją FGFR. Wyniki zostały opublikowane w 2020 roku w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences*.

Na podstawie uzyskanych wyników, zidentyfikowałam jeden wariant dimeru FGF2, jako najbardziej obiecujący do zastosowania jako nośnik leków w terapii ukierunkowanej na FGFR1, ze względu na jego nadzwyczajną zdolność wydajnej i selektywnej internalizacji do komórek z nadekspresją FGFR1. Układ FGF/FGFR stanowi optymalny cel molekularny w terapiach przeciwnowotworowych ze względu na fundamentalny charakter procesów, za których regulację jest odpowiedzialny. Zaburzenia osi sygnalizacyjnej FGF/FGFR są związane z różnymi patologiami. Mogą to być amplifikacje lub mutacje genów *FGFR*, lub zmiany w regulacji transkrypcji i translacji, prowadzące do nadprodukcji receptorów na powierzchni komórek nowotworowych. Zmiany molekularne w receptorach FGF w komórkach nowotworowych wpływają na ich wzrost, proliferację, angiogenezę i inwazyjność.

W kolejnym etapie pracy doktorskiej opracowałam wysoce cytotoksyczny koniugat składający się z dimeru FGF2 oraz dwóch silnych toksyn o całkowicie niezależnych mechanizmach działania – amanityny alfa i monometylo aurystatyny E. Leki zostały specyficznym przyłączone do dimeru metodami ligacji enzymatycznych, w których pośredniczyły enzymy Snoop ligaza (ang. *SnoopLigase*) i sortaza A (ang. *sortase A*). Powstały dimeryczny koniugat z dwoma silnymi lekami cytotoksycznymi selektywnie wiązał się, a następnie internalizował do komórek nowotworowych z nadekspresją FGFR1. Wyniki badań cytotoksyczności pokazują, że opracowany podwójny koniugat dimeru FGF2 z amanityną alfa oraz monometylo aurystatyną E wykazuje około 10-krotnie wyższą toksyczność wobec linii komórkowych nadekspresjonujących FGFR1 niż równomolowa mieszanina pojedynczych koniugatów monomerycznych z amanityną alfa lub monometylo aurystatyną E. Zastosowanie dwóch cytostatyków o różnych mechanizmach działania, zdolności przenikania przez błony biologiczne i podatności na aktywne wypompowywanie z komórki może być użyteczne w leczeniu heterogennych guzów i wykazywać większą skuteczność w stosunku do komórek o dużym potencjale do nabywania lekooporności. Wyniki tej części pracy zostały opublikowane w 2023 roku w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences*.