

Karolina Świdarska

***Koniugat zasadowego fibroblastycznego czynnika wzrostu (FGF2) zawierający dwa związki cytotoksyczne o różnym mechanizmie działania***

**STRESZCZENIE**

Heterogenność komórek nowotworowych oraz związana z nią lekooporność stanowią obecnie poważny i złożony problem terapii przeciwnowotworowych, w tym terapii celowanych. Prowadzą one bowiem do obniżenia skuteczności leczenia, częstych nawrotów oraz przerzutów choroby nowotworowej. Celem przedstawionej rozprawy doktorskiej było wykorzystanie ukierunkowanego dostarczania dwóch związków cytotoksycznych, o różnych mechanizmach działania, za pomocą białka FGF2 do komórek nowotworowych. Białko to stanowi naturalny ligand dla receptora FGFR1, którego nadprodukcję zidentyfikowano w wielu nowotworach złośliwych, w tym nowotworach płuc, charakteryzujących się wysoką heterogennością oraz wykazujących niski 5-letni wskaźnik przeżycia pacjentów.

W pierwszym etapie pracy nadprodukowano, oczyszczono oraz scharakteryzowano białko FGF2 zawierające nienaturalną resztę aminokwasową – propargylolizynę. Jej wprowadzenie wykonano za pomocą kodonu amber oraz ortogonalnej pary syntetaza aminoacylo tRNA/tRNA supresorowe, pochodzącej z organizmu *Methanosarcina mazei*. Obecność propargylolizyny w sekwencji białka pozwoliła na przyłączenie pochodnej monometyloaurystatyny E w wyniku zoptymalizowanej reakcji cykloaddycji azydków do terminalnych alkinów katalizowanej jonami Cu(I). Drugi związek będący pochodną  $\alpha$ -amanityny przyłączono do pozostałej powierzchniowej reszty cysteiny stosując reakcję tiol-maleimid. Obie reakcje pozwoliły na wydajne otrzymanie jednorodnego produktu, zawierającego jednocześnie dwa związki cytotoksyczne o różnych mechanizmach działania.

Drugim etapem przedstawionej pracy była charakterystyka podwójnego koniugatu, potwierdzająca jego czystość oraz zachowanie struktury drugorzędowej. Charakterystykę wykonano przy użyciu, kolejno rozdzału elektroforetycznego w warunkach denaturujących, spektrometrii mas oraz metody dichroizmu kołowego. Wykorzystano również analizę za pomocą interferometrii bio-warstwowej, która wykazała, że białko FGF2, pomimo modyfikacji dwoma związkami cytotoksycznymi, nadal ulega wiązaniu do receptora FGFR1. Wiązanie to potwierdzono również testami *in vitro* na komórkach mysich fibroblastów płodowych, dzięki analizie aktywacji głównych kaskad sygnałowych: PLC $\gamma$ /PKC, PI3K/Akt oraz Ras/MAPK. Mikroskopia fluorescencyjna potwierdziła zależną od receptora FGF internalizację oraz lokalizację podwójnego koniugatu w strukturach lizosomów. Oba te procesy, internalizacja oraz lokalizacja w lizosomach, są niezbędne dla prawidłowego i efektywnego mechanizmu działania podwójnego koniugatu.

Najważniejszy etap badań stanowiła analiza potencjału cytotoksycznego podwójnego koniugatu względem komórek linii nowotworów płuc oraz ludzkiego kostniakomięsa. W pracy wykorzystano również mysie komórki pro-B limfoidalne, które stanowiły kontrolę komórek zdrowych. Podwójny koniugat wykazał silną cytotoksyczność względem linii FGFR1-pozytywnych: NCI H446 i linii modelowych stabilnie transfekowanych genem *fgfr1* U2OS-FGFR1 oraz BAF3-FGFR1, obniżając żywotność komórek o ponad 90%. Ponadto, w przypadku linii drobnokomórkowego raka płuc (NCI H446), wykazującego oporność na chemioterapeutyki takie jak etopozyd oraz cisplatyna, uzyskano wysoki efekt cytotoksyczny, pomimo braku aktywności antyproliferacyjnej koniugatów pojedynczo podstawionych pochodną  $\alpha$ -amanityny lub pochodną MMAE.

Podsumowując, uzyskane w przedstawionej pracy doktorskiej wyniki potwierdziły wysoki potencjał białka FGF2 do ukierunkowanego i efektywnego dostarczania związków cytotoksycznych do komórek nowotworowych charakteryzujących się nadprodukcją receptora FGFR1. Jednoczesne zastosowanie  $\alpha$ -amanityny oraz monometyloaurystatyny E umożliwiło uzyskanie wysokiego synergistycznego efektu cytotoksycznego, również w przypadku komórek wykazujących lekooporność.