

Aleksandra Anna Czyrek

Opracowanie wariantów białka FGF1 o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu cukrzycy typu II

STRESZCZENIE

Według danych *International Diabetes Federation* z 2021 r. prawie 540 mln ludzi na świecie cierpi z powodu cukrzycy. Jest to pierwsza niezakaźna choroba, której nadano status pandemii XXI wieku. Wynika to z wyjątkowo szybkiego wzrostu liczby osób dotkniętych tą chorobą. Szacuje się, że w przeciągu kolejnych 20 lat liczba cukrzyków wzrośnie do 800 mln. Cukrzyca typu 2, spowodowana głównie otyłością, stanowi około 90% wszystkich przypadków tej choroby i związana jest z insulinoopornością. Mimo znaczących postępów w medycynie, cukrzyca oraz będące jej następstwami powikłania nie są w pełni kontrolowane, a obecnie stosowane terapie niosą za sobą szereg skutków ubocznych, takich jak wzrost wagi, spadek gęstości kostnej czy zaburzenie homeostazy wapniowej i fosforanowej organizmu. Dlatego też tak istotne jest poszukiwanie nowych rozwiązań terapeutycznych. Obiecującym kandydatem na lek w terapii cukrzycy typu 2 jest czynnik wzrostu fibroblastów 1 (FGF1), który nie tylko istotnie obniża poziom glukozy we krwi w zwierzęcym modelu cukrzycy, ale również pozbawiony jest niepożądanych efektów i nie powoduje stanów hipoglikemii. Jednak głównym przeciwwskazaniem w stosowaniu go w charakterze leku przeciwcukrzycowego wydaje się być jego wysoki potencjał mitogenny.

Celem realizowanej pracy doktorskiej było uzyskanie zmodyfikowanego, ludzkiego czynnika wzrostu fibroblastów (FGF1), zachowującego właściwości przeciwcukrzycowe przy jednocześnie obniżonej aktywności proliferacyjnej, mogącego stanowić alternatywną terapię dla pacjentów cierpiących na cukrzycę typu 2.

W pierwszym etapie projektu otrzymano 38 rekombinowanych wariantów FGF1. Strategia projektowania mutantów obejmowała wprowadzenie do sekwencji białka zmian mających na celu obniżenie powinowactwa do receptora FGF, osłabienie wiązania do heparyny, zwiększenie stabilności białka, a także weryfikację znaczenia oddziaływania FGF1 z integryną $\alpha V\beta 3$ oraz fosforylacji FGF1 dla jego aktywności metabolicznej. Dodatkowo przetestowano również opisane w literaturze warianty FGF1 pod kątem ich zastosowania do normowania poziomu glukozy we krwi. Wybrane podstawienia zostały także połączone w wielokrotnych wariantach mutacyjnych. Białka wydajnie nadprodukowano, oczyszczono, a następnie potwierdzono ich tożsamość i natywność, końcowo uzyskując preparaty o czystości powyżej 95%. Następnie przeprowadzono ich charakterystykę biologiczną *in vitro*, obejmującą analizę aktywności mitogennej, aktywacji głównych szlaków sygnałowych zależnych od

FGFR oraz ocenę potencjału przeciwcukrzycowego (zdolności do indukcji wychwytu glukozy). Wybrane muteiny zostały scharakteryzowane biofizycznie poprzez określenie ich parametrów termodynamicznych oraz powinowactwa do receptora 1c FGF. Kolejny etap badań obejmował sprawdzenie działania wybranych wariantów mutacyjnych w mysim modelu cukrzycy, *db/db*. Na podstawie wyników otrzymanych w testach *in vitro* wybrano 15 białek do testów na zwierzętach. Preparaty białkowe podano podskórnym myszom, a następnie przez siedem dni analizowano poziom glukozy w ich krwi oraz masę ciała. Pozwoliło to na wytypowanie dwóch mutein, które spełniały założenia postawione w projekcie, to jest wykazywały obniżoną mitogenność przy zachowaniu właściwości przeciwcukrzycowych. Ostatni etap projektu obejmował próbę wyjaśnienia mechanizmu przeciwcukrzycowego działania FGF1, który do tej pory nie został opisany. Z wykorzystaniem technik inżynierii białka oraz biologii molekularnej udało się zidentyfikować nowe białko partnerskie kompleksu FGF1:FGFR1, kluczowe dla metabolicznej aktywności białka FGF1.