



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE
WYDZIAŁ CHEMII

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**Small-molecule inhibitors of CD44-hyaluronan and
MDM2-p53 interactions**

mgr Mirosława Czub

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem Prof. dr Tadeusza Holaka

Choroby nowotworowe są poważnym i powszechnie występującym problemem zdrowia publicznego. Zaraz po chorobach układu krążenia stanowią drugą przyczynę zgonów, wśród ludzi żyjących w krajach rozwiniętych. Zredukowanie barier leżących u podstaw leczenia raka ma kluczowe znaczenie w walce o eliminację cierpienia i śmierci będących jego skutkiem. Naukowcy na całym świecie nieustannie poszukują nowych strategii w walce z tą śmiertelną chorobą.

CD44 jest wielofunkcyjną, transbłonową glikoproteiną powierzchniową komórki. Białko to jest zaangażowane w interakcje międzykomórkowe oraz jest mediatorem w stymulowaniu wielu procesów: adhezji komórkowej, agregacji, migracji czy proliferacji. Dzięki temu jest związane z procesami biologicznymi obejmującymi hematopoezę, angiogenezę, stany zapalne, gojenie się ran, metabolizm kości, przerzuty nowotworowe. Komórki nowotworowe charakteryzują się zwiększoną ekspresją CD44, co więcej udowodniono, że jego zwiększona obecność jest odpowiedzialna za oporność na radioterapię w przypadku nowotworów krtani i prostaty oraz zwiększoną oporność na chemioterapię w nowotworach trzustki i żołądka.

CD44 jest receptorem kwasu hialuronowego (HA), odpowiada za jego internalizację do wnętrza komórki jak również jego degradację. Może też oddziaływać z innymi ligandami, takimi jak: metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs), kolagen, osteopontyna (OPN).

Możliwość modulowania oddziaływania CD44-kwas hialuronowy z zastosowaniem inhibitorów małowcząsteczkowych mogłaby mieć ogromne znaczenie w postępie onkologii. Do tej pory opublikowano bardzo niewiele prac pokazujących związek wykazujące oddziaływanie z białkiem CD44, które samo w sobie nie jest łatwym przedmiotem badań w tym kierunku, ze względu na płytką kieszeń wiążącą.

Supresor nowotworowy p53, kodowany przez gen supresorowy TP53, jako czynnik transkrypcyjny, stanowi jeden z najważniejszych białek, niezbędnych w komórkach do obrony przed wejściem na drogę nowotworzenia i tym samym powielania mutacji czy wad komórkowych. p53 zwany również „strażnikiem genomu” w odpowiedzi na sygnały stresu komórkowego (np. uszkodzenie DNA), uruchamia mechanizmy naprawcze tudzież destrukcyjne dla komórki, poprzez aktywację ekspresji genów odpowiedzialnych za zatrzymanie cyklu komórkowego, reparację uszkodzonego DNA lub uruchomienie procesu zaprogramowanej śmierci komórki - apoptozy. W przypadku chorób nowotworowych, aktywność białka p53 jest hamowana na drodze mutacji w genie TP53 lub poprzez nadekspresję jego negatywnych regulatorów - MDM2, MDMX. Regulowanie szlaku p53-MDM2/MDMX przy pomocy niskocząsteczkowych inhibitorów stanowi znaną na całym świecie strategię

terapii nowotworowej. Praca nad poprawą efektywności inhibitorów tego szlaku, mająca na celu zwiększenie rozpuszczalności i przenikalności tych związków przez błonę komórkową, stanowi bardzo ważny punkt strategiczny w rozwoju metodologii zwalczania chorób nowotworowych.

Celem pracy doktorskiej było znalezienie małowzrostkowych inhibitorów oddziaływania CD44-kwas hialuronowy oraz opracowanie innowacyjnego podejścia wprowadzania do komórki małowzrostkowych inhibitorów interakcji białko-białko: MDM2-p53 poprzez skoniugowanie znanych inhibitorów MDM2 z oktamerem kwasu hialuronowego.

W pracy doktorskiej przedstawiono ekspresję rekombinowanego białka CD44 w bakteryjnym systemie ekspresyjnym *E. Coli* oraz jego oczyszczanie z wykorzystaniem metod chromatograficznych. Badania NMR przeprowadzono na białku znakowanym izotopem ^{15}N , którego ekspresję prowadzono w medium M9. Białko było ekspresjonowane w postaci ciałek inkluzyjnych, które następnie wymagały rozpuszczenia, a sama proteina ponownej renaturacji.

Niniejsza praca przedstawia wyniki badań, w których zidentyfikowano cztery nowe fragmenty, wykazujące wiązanie się z CD44. Związki te zostały odkryte w testach przesiewowych biblioteki związków, przy zastosowaniu metody NMR ^1H - ^{15}N SOFAST HMQC i mogą stanowić struktury wyjściowe dla potencjalnych inhibitorów tego receptora. Powinowactwo przedstawionych związków, wyznaczone na podstawie przeprowadzonych badań NMR, mieści się w zakresie milimolarnym. Ponadto stosując ww. metody scharakteryzowano miejsce wiązania się tych związków.

W wyniku przeprowadzonych testów aktywności inhibitorów w obecności naturalnego liganda CD44 - oktameru kwasu hialuronowego, wykazano że wiązanie niektórych związków do CD44 jest niezależne od wiązania się kwasu hialuronowego, tudzież w pozostałych przypadkach wiązanie CD44-oktamer kwasu hialuronowego, blokuje przyłączenie inhibitora. Badania te wskazują więc na więcej niż jedno miejsce wiązania inhibitorów, co może stanowić interesujący punkt wyjścia do opracowania nowych ligandów o wysokim powinowactwie.

Na podstawie otrzymanych wyników, stosując metody TSA i NMR, przebadano 13 innych, podobnych strukturalnie związków. W żadnym z analizowanych przypadków nie otrzymano wyników potwierdzających interakcję białko-inhibitor.

W pracy przedstawiono rozległe próby krystalizacji kompleksów białka CD44 z oktamerem kwasu hialuronowego i małowzrostkowymi inhibitorami. Krystalizację przeprowadzono w dwóch różnych temperaturach: 20°C i 4°C przy użyciu roztworów

krystalizacyjnych dostępnych komercyjnie, jak również przygotowanych własnoręcznie. W podjętych próbach uzyskano kryształy apo-CD44, których strukturę rentgenowską rozwiązano. Nie otrzymano natomiast kryształów kompleksów. Celem krystalizacji białka apo-CD44 było nasączenie kryształów potencjalnymi inhibitorami oraz oligomerami kwasu hialuronowego. Kryształy apo-CD44 uzyskano natomiast tuż przed końcem udziału w projekcie.

Druga część pracy doktorskiej opisuje przygotowanie i charakterystykę kilku oligomerów kwasu hialuronowego (HA6-HA12). Oligosacharydy otrzymano w reakcji trawienia polimeru HA o wysokiej masie cząsteczkowej (HMW HA) przy pomocy hialuronidazy z jąder owiec. Oligomery oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej. Otrzymane oligosacharydy zostały poddane procesom odsalania i liofilizacji. Z 400 mg HMW HA otrzymano 8-12 mg każdego z oligomerów, które posłużyły do przeprowadzenia opisanych eksperymentów. Oktamer kwasu hialuronowego (HA8) został użyty zarówno do analizy jego wpływu na oddziaływanie CD44 z potencjalnymi inhibitorami jak również do syntezy koniugatów z małocząsteczkowymi inhibitorami oddziaływania białko-białko MDM2-p53. Koniugaty mogą stanowić innowacyjne podejście ułatwiające przenikanie inhibitorów małocząsteczkowych do komórek, poprzez zwiększenie ich rozpuszczalności i tym samym poprawę transportu małych cząsteczek do komórek nowotworowych. W pracy przedstawiono metody syntezy ww. koniugatów w reakcjach z zastosowaniem metody karbodiimidowej. Sukcesywnie zsyntetyzowano związek będący połączeniem oktameru kwasu hialuronowego z dihydrazidem kwasu adypinowego (ADH). Podjęto wiele prób mających na celu dołączenie do struktury HA8-ADH związków podobnych strukturalnie do WK23, opisanego w literaturze, jako inhibitor MDM2-p53 (Popowicz, et al., 2010). Pomimo wielu prób nie udało się otrzymać docelowych połączeń HA8-ADH-inhibitor MDM2.

Podsumowując przedstawione badania przyczyniły się do odkrycia nowych małocząsteczkowych związków, które mogą być dalej rozwijane w potencjalne, silne inhibitory białka CD44. Rezultaty przeprowadzonych badań przyczyniły się także do poszerzenia wiedzy na temat oddziaływania inhibitorów z białkiem CD44. Kontynuacja badań nad koniugatami, może posłużyć ułatwieniu wprowadzenia związków o właściwościach terapeutycznych do ich miejsca działania - wnętrza komórek.

Literatura:

1. Popowicz, G.M., Czarna, A., Wolf, S., Wang, K., Wang, W., Dömling, A. and Holak, T.A. (2010). Structures of low molecular weight inhibitors bound to MDMX and MDM2 reveal new approaches for p53-MDMX/MDM2 antagonists drug discovery. *Cell Cycle* 9, 1104-1111.