

Niskocząsteczkowe inhibitory oddziaływania białko-białko w terapii przeciwnowotworowej

mgr Sylwia Krzanik

Choroby nowotworowe stanowią drugą, obok dolegliwości sercowo-naczyniowych, najczęstszą przyczynę śmiertelności w Polsce. Według raportu opublikowanego w 2015 roku przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) są odpowiedzialne za 8,8 miliona zgonów na świecie, a przeprowadzone analizy sugerują, że liczba ta będzie rosła w kolejnych latach. Szacuje się, że rozwojowi 30-50% chorób nowotworowych można zapobiec.

Zapotrzebowanie na nowe strategie terapeutyczne w dziedzinie onkologii jest ogromne. Mimo istnienia wielu tradycyjnych metod leczenia, jak zabieg chirurgiczny, radioterapia czy chemioterapia z użyciem środków cytotoksycznych, u chorych pojawia się szereg skutków ubocznych w wyniku ich genotoksycznego działania oraz niskiej selektywności wobec komórek nowotworowych w stosunku do komórek normalnych.

Oddziaływania typu białko-białko odgrywają kluczową rolę w funkcjonowaniu komórek w zakresie ich prawidłowego podziału, komunikacji międzykomórkowej oraz procesów kierujących metabolizmem komórkowym. Część oddziaływań jest bezpośrednio lub pośrednio wiązana z określonymi stanami chorobowymi, w tym z rozwojem nowotworów. Terapia celowana, umożliwiającą skuteczną i selektywną eliminację komórek nowotworowych bez uszkodzenia komórek zdrowych, leży u podstaw powstawania cząsteczek przeciwnowotworowych nowej generacji. Mają one na celu m.in. blokowanie podwyższonej aktywności białek odpowiedzialnych za wzmożoną proliferację komórek nowotworowych oraz zainicjowanie procesu ich apoptozy. Tematyka niniejszej rozprawy wiąże się z poszukiwaniem inhibitorów oddziaływania białko-białko o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym. Przedmiotem badań były cząsteczki blokujące oddziaływanie białek uczestniczących w dwóch kluczowych szlakach komórkowych, tj. p53/MDM2 i PD-1/PD-L1 oraz te hamujące aktywność deubikwitynazy USP2.

Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym o właściwościach supresora nowotworzenia. Odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi komórki na czynniki stresowe (uszkodzenie DNA, niedotlenienie, nieprawidłowe sygnały proliferacyjne) poprzez zahamowanie cyklu komórkowego lub w przypadku nieodwracalnych uszkodzeń, indukcję apoptozy. W prawidłowych komórkach poziom ekspresji białka p53 jest stosunkowo niski, a jego aktywność ściśle regulowana przez szereg białek, m.in. MDM2 oraz MDMX. Białka te wiążą się do p53 powodując jego inaktywację poprzez blokowanie jego interakcji z czynnikami transkrypcyjnymi, eksport do cytoplazmy oraz kierowanie na drogę proteasomalnej degradacji. W ponad 50% nowotworów białko p53 ulega trwałej inaktywacji w wyniku mutacji punktowych w kodującym je genie *TP53*. Ponadto, w wielu typach nowotworów wykazano nadekspresję białka MDM2, prowadzącą do zahamowania aktywności funkcjonalnego białka p53. Uwolnienie białka p53 z kompleksu z MDM2 umożliwi jego stabilizację oraz przywróci w tych typach nowotworów jego prawidłowe funkcjonowanie.

Deubikwitynaza USP2 należy do grupy proteaz specyficznych dla ubikwityny, które regulują proces usuwania nieprawidłowych białek z komórki poprzez ich degradację proteasomie. USP mają zdolność odcinania cząsteczki ubikwityny od białek, zapobiegając tym samym ich hydrolitycznemu rozkładowi. Nadekspresja USP, w tym USP2, jest wiązana z progresją wielu chorób nowotworowych. Opisano udział USP2 w stabilizacji białek o właściwościach onkogennych, w tym MDM2 oraz cykliny D1, która reguluje przebieg cyklu komórkowego, warunkując przejście z fazy G1 do S. USP2 zapobiegając procesowi ubikwitynacji cykliny D1 wpływa na jej poziom i namnażanie komórek nowotworowych. Regulacja aktywności enzymu USP2 przy użyciu niskocząsteczkowych inhibitorów stanowi zatem obiecujący cel terapeutyczny schorzeń o podłożu onkologicznym. Receptor programowanej śmierci (PD-1) ulega indukowanej ekspresji na powierzchni limfocytów B i T i pełni rolę negatywnego regulatora

odpowiedzi immunologicznej. Oddziałując ze swoimi dwoma ligandami, tj. PD-L1 oraz PD-L2, obecnymi w wielu typach tkanek, PD-1 ogranicza aktywację, proliferację oraz funkcje efektorowe limfocytów T. Zaburzenia funkcjonowania szlaku PD-1/PD-L1 leżą u podstaw rozwoju chorób autoimmunologicznych i są odnotowywane na „wyczerpanych” limfocytach w przebiegu przewlekłych infekcji. Nadekspresja PD-L1 jest opisywana w wielu typach nowotworów. W mikrośrodowisku guza pojawia się przewaga sygnałów hamujących funkcje efektorowe limfocytów T, która wiąże się z ucieczką komórek nowotworowych spod nadzoru układu immunologicznego i ich niekontrolowanymi podziałami. Blokada oddziaływania PD-1/PD-L1 może prowadzić do uzyskania oczekiwanego działania terapeutycznego poprzez zwiększenie odpowiedzi przeciwnowotworowej. Celem pracy było potwierdzenie skuteczności niskocząsteczkowych inhibitorów oddziaływania białko-białko na poziomie komórkowym. Komórki linii U-2 OS, HCT 116, MCF-7 (p53^{wt}) i Saos-2 (p53^{-/-}) traktowano potencjalnymi niskocząsteczkowymi inhibitorami oddziaływania p53/MDM2. Chcąc ustalić stopień zahamowania aktywności metabolicznej na skutek podania inhibitorów, komórki poddano standardowemu testowi żywotności. Równolegle prowadzono badania analizy ekspresji genów przy użyciu hybrydyzacji western blot dla białka p53, MDM2 oraz p21, którego ekspresja jest ściśle kontrolowana przez białko supresorowe p53. Z puli kilkudziesięciu przetestowanych inhibitorów wytypowano kilka o rdzeniu imidazolowym dających obiecującą odpowiedź na poziomie komórkowym. Użyto je w celu analizy zatrzymania cyklu komórkowego za pomocą cytometrii przepływowej (barwienie PI). Inhibitory oddziaływania p53/MDM2 wpływają na podstawowe mechanizmy kontroli cyklu komórkowego i modulują jego etapy, a spodziewanym efektem ich podania jest zatrzymanie cyklu komórkowego na etapie G1/S i/lub G2/M. Analiza otrzymanych wyników wskazała na znacznie zwiększoną frakcję G1 oraz zmniejszoną S przy 5 μ M dawce inhibitorów. Ponadto, zastosowanie stężenia 10 μ M prowadziło do prawie całkowitego wyeliminowania fazy S, przy znaczącym wzroście frakcji G1 i G2/M. Potencjał terapeutyczny niskocząsteczkowych inhibitorów potwierdziły dodatkowo pomiary luminometryczne przeprowadzone z wykorzystaniem wektora reporterowego posiadającego miejsca wiązania dla p53 w promotorze genu kodującego lucyferazę. Wyłonione z biblioteki 1500 związków cząsteczki wykazujące powinowactwo do deubikwitynazy USP2a poddano testom na komórkach linii HCT 116, MCF-7 oraz U-2 OS. Przeprowadzone testy żywotności z użyciem soli tetrazolowej (MTT) wskazały na silne zahamowanie wzrostu komórek linii HCT 116 oraz MCF-7 z wartościami EC₅₀ na poziomie poniżej 10 μ M. Zaobserwowany efekt był skorelowany z widocznym spadkiem ekspresji cykliny D1 oznaczonym metodą western blot.

Do testowania niskocząsteczkowych inhibitorów szlaku PD-1/PD-L1 wykorzystano ludzkie limfocyty T o fenotypie CD4⁺ i CD8⁺ izolowane z krwi obwodowej dawców. Za pomocą techniki cytometrii przepływowej wykonano badania zmiany poziomu apoptozy oraz stopnia proliferacji komórek. W ramach przeprowadzonych badań nie udało się potwierdzić wpływu weryfikowanych związków na analizowane parametry. Podjęte próby nie doprowadziły do uzyskania wiarygodnych i powtarzalnych rezultatów. Zastosowany model eksperymentalny wymaga dalszej optymalizacji.

Przedstawione eksperymenty przyczyniły się do potwierdzenia aktywności biologicznej testowanych inhibitorów oddziaływania p53/MDM2 oraz deubikwitynazy USP2a.

W połączeniu z badaniami strukturalnymi i biochemicznymi wskazują na duży potencjał terapeutyczny niskocząsteczkowych inhibitorów i możliwość ich zastosowania w celowanej terapii przeciwnowotworowej.

11-10-2018

Sybilio
Kronik