

Białko p53 nazywane jest „strażnikiem genomu” z uwagi na jego kluczowe znaczenie w utrzymaniu stabilności genetycznej komórek i supresji transformacji nowotworowej. Jako czynnik transkrypcyjny, p53 odpowiada za regulację ekspresji szeregu genów docelowych zaangażowanych w kontrolę cyklu komórkowego, naprawę DNA, apoptozę, angiogenezę, migrację, różnicowanie czy starzenie się. W odpowiedzi na stres, białko p53 hamuje cykl komórkowy, indukuje mechanizmy naprawcze, a w przypadku niepowodzenia tego procesu kieruje komórkę na drogę śmierci apoptotycznej. Procesy nowotworzenia są silnie związane z zaburzeniami funkcjonowania białka p53. W około połowie nowotworów obserwujemy inaktywację p53 na skutek mutacji punktowych lub delecji w obrębie genu kodującego p53. W pozostałych nowotworach, posiadających białko p53 typu dzikiego, obserwujemy jego funkcjonalną inaktywację wynikającą z nadekspresji negatywnych regulatorów, z których dwa najważniejsze stanowią białka MDM2 i MDMX. Oba białka działają komplementarnie w regulacji funkcji p53: MDM2 odpowiada za kontrolę poziomu p53 w komórce, a MDMX reguluje aktywność transkrypcyjną p53. W nowotworach charakteryzujących się nadekspresją MDM2 lub MDMX, zahamowanie oddziaływania MDM2/MDMX-p53 prowadzi do aktywacji białka p53, a w następstwie do regresji nowotworu. Obserwacje te stały się centralnym punktem badań wielu laboratoriów na całym świecie i doprowadziły do odkrycia szeregu niskocząsteczkowych inhibitorów MDM2, z których część znajduje się obecnie w I fazie badań klinicznych. Wiele z tych cząsteczek ma jednak znacznie słabszy potencjał inhibitorowy względem oddziaływania MDMX-p53. Ponadto, w komórkach z nadekspresją MDMX, białko MDMX tłumi proapoptotyczne działanie antagonistów interakcji MDM2-p53. Z przedstawionych faktów wynika, że inhibitory oddziaływania MDM2-p53 mogą w sposób niewystarczający chronić komórkę przed onkogennymi właściwościami białka MDMX. Szczególnie pożądane są zatem dualne inhibitory oddziaływania obu białek MDM z p53, co powinno doprowadzić do maksymalnego efektu w komórkach nowotworowych z niezmutowanym białkiem p53.

Celem badań przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej było opracowanie funkcjonalnych testów pozwalających na poszukiwanie dualnych inhibitorów oddziaływania MDM2 i MDMX z białkiem p53, a następnie identyfikacja i charakterystyka niskocząsteczkowych inhibitorów oddziaływania MDMX-p53 o silniejszym potencjale od związków dotychczas opisanych. Równolegle prowadzono prace zmierzające do opracowania aptamerów zdolnych do wiązania białka MDM2. Należy podkreślić, że aptamery stanowią nowatorskie podejście do problemu inhibicji oddziaływań białko-białko w przypadku interakcji MDM2/MDMX-p53.

Wykorzystując rekombinowane N-końcowe domeny białek MDM2 i MDMX oraz znakowany fluorescencyjnie peptyd stanowiący kluczowy fragment białka p53 zoptymalizowano metodę detekcji inhibitorów oddziaływania białek MDM2/MDMX-p53 opartą na analizie zmian polaryzacji fluorescencji. Opracowana metoda pozwala na precyzyjne określanie stałej inhibicji potencjalnych antagonistów nawet na poziomie nanomolarnym. Z kolei, wysoka stabilność testu umożliwia jego rutynowe stosowanie w warunkach wysokoprzepustowych. Prace te stały się podstawą do przygotowania zgłoszenia patentowego obejmującego metodologię testowania

potencjalnych inhibitorów oddziaływania MDM2/MDMX-p53, a ich kluczowe wyniki przedstawiono w publikacji: „High affinity interaction of the p53 peptide-analogue with human Mdm2 and Mdmx”, *Cell Cycle*, 2009; 8(8):1176-84.

W 2010 roku Reed i współpracownicy odkryli pierwszy niskocząsteczkowy inhibitor oddziaływania MDMX-p53 - związek SJ-172550. W poszukiwaniu skuteczniejszych inhibitorów interakcji MDMX-p53, w niniejszej pracy scharakteryzowano kilkadziesiąt pochodnych związków SJ-172550, wykazując ich zdolność do inhibicji wspomnianego oddziaływania. Analiza badanych związków wykazała jednak, że cząsteczki te cechuje zdolność do modyfikacji grup sulfhydrylowych. Ponadto, w dalszych eksperymentach ujawniono, że inne związki zdolne do takiej modyfikacji stanowią pseudoinhibitory oddziaływania MDM2/MDMX-p53. Tym samym związki z rodziny SJ nie stanowią niestety dogodnej bazy do ich dalszej optymalizacji w kierunku inhibitorów o aktywności w warunkach *in vivo*. Wyniki tych prac, obejmujące między innymi szczegółową charakterystykę mechanizmu działania związków α,β -nienasyconych, zawarto w publikacji: „On the mechanism of action of SJ-172550 in inhibiting the interaction of MDM4 and p53”, *PLOS One*, 2012, 6:e37518.

Równoległe do prób rozwoju związków niskocząsteczkowych przeprowadzono selekcję *in vitro* aptamerów wiążących białko MDM2 oraz ich charakterystykę. Aptamery to krótkie, jednoniciowe cząsteczki DNA lub RNA charakteryzujące się wysokim powinowactwem i specyficnością wiązania różnorodnych cząsteczek docelowych, w tym białek. W celu identyfikacji aptamerów wiążących N-końcową domenę białka MDM2 (potencjalnych inhibitorów oddziaływania MDM2-p53) przeprowadzono kilka selekcji *in vitro*. Wzbogacenie wyjściowej biblioteki monitorowano stosując nową metodę opartą na ilościowym PCR, opracowaną w naszym laboratorium. Otrzymane w wyniku selekcji aptamery stanowią długie 90-nukleotydowe sekwencje, dlatego podjęto próby zidentyfikowania fragmentów odpowiedzialnych za interakcję z białkiem MDM2. Procedurze skracania poddano aptamery charakteryzujące się najwyższym stopniem wiązania. Ostatecznie uzyskano 35-nukleotydowe aptamery o wysokiej specyficznosci i mikromolarnych równowagowych stałych dysocjacji. Wykazano stabilność badanych aptamerów w hodowlach komórkowych i w surowicy. Kluczowym eksperymentem tej części prac było wykazanie, iż testowane aptamery posiadają różnicowy wpływ na żywotność komórek nowotworowych p53+/+ i p53-/- i zgodnie z oczekiwaniami wybiórczo zabijają jedynie komórki p53+/+. Wyniki tych prac zastrzeżono dokumentem patentowym: „Aptamery posiadające powinowactwo do białka MDM2, ich kompozycje oraz zastosowanie”.

Podsumowując, przedstawione prace badawcze doprowadziły do opracowania skutecznej metody umożliwiającej wykrywanie dualnych inhibitorów oddziaływania MDM2 i MDMX z białkiem p53. Dla klasy związków opisanej oryginalnie w literaturze jako inhibitory oddziaływania MDMX-p53 ujawniono rzeczywisty mechanizm ich działania poprzez niespecyficzną, kowalencyjną modyfikację białka. Za najistotniejsze osiągnięcie pracy należy uznać zidentyfikowanie aptamerów skierowanych przeciwko białku MDM2 i wykazanie, iż cząsteczki te specyficznie obniżają żywotność komórek nowotworowych posiadających niezmutowane białko p53. Tym samym zidentyfikowane aptamery stanowią odpowiednią bazę do ich dalszej optymalizacji w kierunku cząsteczek o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych.

Hebaudie Reed