

mgr Damian Kaniowski

Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi

ROZPRAWA DOKTORSKA

Oligonukleotydy antysensowe i ich nanostruktury skoniugowane z klastrami boru; charakterystyka fizykochemiczna i biologiczna

STRESZCZENIE

Zgodnie z dostępnymi danymi epidemiologicznymi liczba pacjentów z chorobami nowotworowymi stopniowo rośnie w skali globalnej. Najczęściej diagnozowane rodzaje raka u ludzi to rak płuc, skóry, piersi, jajnika, wątroby, okrężnicy i mózgu. Co ciekawe, wszystkie z nich charakteryzują się wysokim stężeniem onkogenu kodującego receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR). W organizmie ludzkim stymulowany EGFR przekazuje odpowiedź do wnętrza komórki i uczestniczy w różnych procesach komórkowych, w tym w proliferacji komórek, ich przeżyciu, wzroście i rozwoju. Nieprawidłowe funkcjonowanie onkogenu *EGFR* i jego zwiększona ekspresja mają kluczowe znaczenie w rozwoju nowotworów złośliwych i ich przerzutach do innych narządów organizmu. Dlatego rozwój terapii genowych mających na celu inhibicję ekspresji genów odpowiedzialnych za rozwój choroby jest pilną potrzebą wyleczenia pacjentów z rakiem i poprawy jakości ich życia.

Moja rozprawa doktorska dotyczy dekorowanych klastrami boru oligonukleotydów antysensowych (B-ASO), zarówno w ich postaci liniowej, jak i zawartych w nanostrukturach, skierowanych na mRNA kodujące białko EGFR. B-ASO są zaprojektowane tak, aby pełniły podwójną rolę w terapii przeciwnowotworowej. Z jednej strony mają prowadzić do obniżenia poziomu ekspresji receptora EGFR, a tym samym hamować wzrost i rozwój komórek nowotworowych. Z drugiej strony są „nosicielami” atomów boru potrzebnych w radioterapii BCNT mającej na celu zabijanie komórek nowotworowych.

Pierwszym celem moich badań było opracowanie testu podwójnej fluorescencji opartego na ekspresji plazmidu fuzyjnego kodującego gen białka zielonej fluorescencji z genem EGFR oraz plazmidu kodującego białko czerwonej fluorescencji (GFP-EGFR / RFP) (DFA). Wykorzystując

DFA zbadałem aktywność wyciszającą biblioteki liniowych modeli B-ASO ozdobionych trzema różnymi klastrami boru i wykazałem, że testowane B-ASO są niezwykle aktywne jako inhibitory ekspresji EGFR w komórkach HeLa. Co ciekawe, oligonukleotydy B-ASO wielokrotnie modyfikowane resztami metalakaboranu (FESAN) skutecznie obniżały poziom EGFR, pomimo bogatej dekoracji klastrami boru. Ponadto, wolne klatki boru i te, wbudowane w łańcuch ASO wykazują silne powinowactwo do białek i kwasów nukleinowych.

Następnie zaprojektowaliśmy specjalny dipod B-ASO (zsyntetyzowany przez nasz zespół), w którym klatka 1,2-dikarba-*closo*-dodekarboranu posłużyła jako platforma do koniugacji z dwoma nićmi ASO ukierunkowanymi na gen EGFR. Odkryłem, że taki dipod B-ASO anty-EGFR jest w stanie tworzyć struktury wyższego rzędu ze swoim komplementarnym odpowiednikiem (B-anty-ASO). Analizy mikroskopowe AFM i cryo-TEM dostarczyły cennych informacji o strukturze, kształcie i rozmiarze tych struktur wyższego rzędu. Okazało się, że były to pierścieniowe nano-objekty złożone z fragmentów DNA (ASO / anty-ASO) o łącznej liczbie od 44 do 176 par zasad. Nanostruktury wykazywały zwiększoną stabilność nukleolityczną i wysoką aktywność hamującą wobec EGFR zarówno w modelu egzogennym DFA, testowanym w 3 liniach komórek nowotworowych (A431, HeLa, MCF-7), jak i w komórkach A431 (endogenny poziom EGFR określony metodą Western Blot).

Co ciekawe, nanostruktury nie indukowały stanu zapalnego makrofagów pozyskanych od zdrowych dawców, co jest korzystną właściwością nośników boru. Analiza ICP MS potwierdziła, że nanostruktury są w stanie dostarczyć wystarczającą ilość atomów boru do komórek A431, spełniając wymagania terapii BNCT.