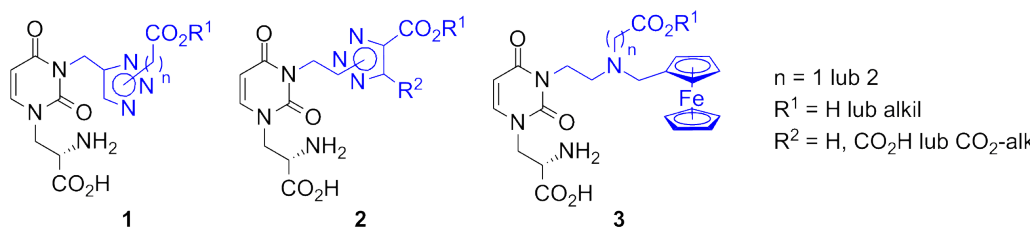


Leczenie chorób nowotworowych jest ogromnym wyzwaniem zarówno dla praktykujących lekarzy, jak i dla naukowców opracowujących nowe, skuteczne terapie. Głównymi celami innowacyjnej medycyny jest zapobieganie nowym zachorowaniom na choroby nowotworowe, a także ograniczenie śmiertelności pacjentów chorych na raka. Do realizacji tych celów niezbędny jest rozwój nowoczesnych metod diagnostycznych oraz skutecznych leków. Skuteczność nowego leku nie jest jedynym kryterium jego przydatności w medycynie. Naukowcy je opracowując koncentrują się także na ograniczeniu skutków ubocznych jego stosowania. Wiele obecnie stosowanych leków przeciwnowotworowych charakteryzuje niewielka specyficzność względem komórek nowotworu. W konsekwencji niszczeniu ulegają także komórki prawidłowe, a leczeniu towarzyszą dotkliwie skutki uboczne. Z tego powodu opracowywanie nowych leków jest nieodzowne. Wciąż trwają badania mające na celu poznanie różnic między komórkami zdrowymi i nowotworowymi. Niektóre z różnic dotyczą występowania związków szkodliwych dla niektórych enzymów, lub związków aktywnych wobec receptorów znajdujących się na powierzchni komórek nowotworowych. Znalezienie związków chemicznych obniżających aktywność tych dla rozwoju nowotworu enzymów, lub wpływających na aktywność receptorów prowadzi do opracowania nowych, skutecznych chemioterapeutyków.

Nasz projekt jest ukierunkowany na poszukiwanie nowych substancji chemicznych o działaniu przeciwnowotworowym, ukierunkowanych na obniżenie aktywności jonotropowych receptorów glutaminianowych AMPA (iGluR). Receptory jonotropowe pełnią funkcje kanałów jonowych dla Ca^{2+} i Na^{+} . Znaczenie iGluR w metabolizmie i proliferacji komórek nowotworowych potwierdzono doświadczalnie. Wyciszenie ekspresji genu kodującego GluR1 wykazano, że one niezbędne do proliferacji i migracji komórek nowotworowych. Dalsze badania wykazały, że wiązanie się receptorów GluR1 do powierzchni komórek nowotworowych jest regulowane poprzez ich fosforylację zależną od aktywności kinazy kazeinowej CK2, której podwyższenie aktywności w komórkach wielu rodzajów nowotworów opisano w wielu publikacjach. Powyższe fakty skłoniły nas do podjęcia badań dotyczących jednoczesnego zastosowania znanych inhibitorów kinazy CK2 oraz nowych antagonistów receptorów glutaminianowych, których metod syntezy opracujemy.

Wytypowaliśmy do tego celu grupę związków 1-3 pokazanych na Rys. 1, będących pochodnymi naturalnego nukleoaminokwasu – willardiiny. Skuteczność zsyntetyzowanych związków zbadamy na liniach komórkowych wybranych złośliwych nowotworów mózgu (glejaka i nerwiaka zarodkowego) oraz na linii komórkowej raka płuc. Zbadamy też wpływ naszych związków na wiązanie się naturalnego liganda tych receptorów jakim jest kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izooksazolopropionowy (AMPA). Jak wskazują dane z literatury, dotychczas opisane pochodne willardiiny stanowią relatywnie niewielką grupę związków. Ponadto do tej pory ich właściwości przeciwnowotworowe nie były badane. Wytypowane do naszych badań związki 1-3 nie są opisane w literaturze chemicznej. Opracowanie efektywnych metod ich syntezy jest naszym pierwszym zadaniem. Podczas realizacji tego celu skoncentrujemy się na: wykorzystaniu łatwo dostępnych substratów, ograniczeniu liczby etapów po reakcjach i zapewnieniu wysokich wydajności kolejnych przekształceń chemicznych. Wartości dodane naszych badań syntetycznych będzie poszerzenie obecnego stanu wiedzy na temat reaktywności szeregu klas związków organicznych, np. pochodnych 1,2,3-triazolu w zależności od sposobu podstawienia pierścienia, ferrocenylo-amino kwasów oraz nowych nukleoaminokwasów. Do identyfikacji strukturalnej związków po reakcjach i docelowych pochodnych 1-3 wykorzystamy nowoczesne metody spektralne (np. metod 2D NMR). Nasze doświadczenia z zakresu syntezy oraz wyniki analiz strukturalnych opublikujemy w renomowanych czasopismach naukowych.



Rysunek 1. Nowe pochodne willardiiny - potencjalne chemioterapeutyki onkologiczne

Badania biologiczne dotyczyć będą określenia stopnia aktywności przeciwnowotworowej nowo zsyntetyzowanych substancji, a w szczególności:

1. określenia wpływu badanych związków na proliferację komórek nowotworowych w różnych przedziałach czasowych (24-96 godzin). W tym celu oprócz testu MTT opartego na pomiarze aktywności metabolicznej komórek i ocenie stopnia cytotoksyczności badanych związków, będzie wykonany test określający inkorporację bromodeoksyrydyny (BrdUrd) do DNA, jako typowy test oceny stopnia proliferacji komórek nowotworowych;
2. oceny stopnia apoptozy komórek nowotworowych - jednego z podstawowych mechanizmów cytotoksyczności chemioterapeutyków (test kolorymetryczny typu ELISA - Cell DeathDetection ELISAPLUS kit (Roche), z użyciem cytometru przepływowego (FACS Calibur) oraz klasyczne badania aktywacji kaspaz 3 oraz 7, z użyciem odpowiednich przeciwciał rozpoznających aktywne formy powyższych kaspaz - technika western blot.

W badaniach zostaną wykorzystane rekombinowane receptory GluR1 i GluR2, otrzymywane w bakteriiach *E.coli* w postaci skróconych konstruktów HS1S2. Konstrukt HS1S2 jest zbudowany z dwóch segmentów polipeptydowych tworzących po solubilizacji ciał inkluzyjnych rozpuszczalne domeny wiążące ligand (glutamin lub AMPA). Pełne wersje receptorów będą nadprodukowane w komórkach owadźcych (Sf9) lub komórkach ssaczych. W metodzie tej izoluje się frakcję membranową zawierającą receptory lub oczyszcza nadprodukowane białko z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa.

Wpływ nowych pochodnych willardiiny na wiązanie się AMPA do receptorów zostanie zbadany metodą izotopową. Zbadamy też powierzchniową ekspresję receptorów GluR1 i GluR2 w komórkach traktowanych i nietraktowanych antagonistami AMPA oraz inhibitorami CK2 z wykorzystaniem metody immunodetekcji i mikroskopii konfokalnej.

W tym elemencie realizacji naszego badania będzie współpraca ze studentami Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej. W rezultacie tej współpracy powstanie szereg prac dyplomowych, a doświadczenia zawodowe uzyskane przez

studentów wzmocni ich pozycj na rynku pracy