

Numer rejestracyjny wniosku: 606459; kierownik projektu dr Przemysław Karpowicz

## **Opracowanie i badania nowego typu stymulatorów gojenia ran opartych o pętle wiążące rodziny czynników wzrostu PDGF i VEGF**

Szacuje się, że rocznie około 1-2% Europejczyków cierpi z powodu tzw. ran przewlekłych, których leczenie pochłania nawet 2-3% budżetu. Szczególnie problematyczne grupy stanowią: pacjenci po radio- i chemioterapii, osoby z przewlekłymi odleżynami, owrzodzeniem żylnym, oraz co ważne - pacjenci z cukrzycą. Dane w tej grupie pokazują, że aż w 15-30% pacjentów boryka się z problemem trudno gojących się ran prowadząc do tzw. stopy cukrzycowej. Rany tego typu, oprócz znacznych kosztów leczenia, co ważniejsze, prowadzą w około 20% przypadków do amputacji kończyn. Patofizjologiczne podstawy tworzenia i przebiegu tej choroby nie są do końca poznane. Wiele badań wskazuje jednak, że jednym z jej powodów jest obniżenie poziomu tzw. czynników wzrostu. W momencie np. zranienia są one produkowane i wiążą się z zewnątrzkomórkowymi receptorami wpływając na proliferację, migrację czy różnicowanie komórek skóry. Badania pokazują, że u osób ze stopą cukrzycową, m.in. poziom czynników wzrostu (oraz ich receptorów) takich jak: płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF) oraz czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego VEGF, jest obniżony. Czynniki te występują w postaci hetero lub homodimerów tj. PDGF-BB, AB, CC, DD i VEGF-AA, BB, CC, DD itp. Wiążą się one głównie do receptorów PDGFR  $\alpha/\beta$  oraz VEGFR1-2 powodując ich dimeryzację, a w efekcie wewnątrzkomórkową fosforylację i aktywację procesów komórkowych. Geny kodujące białka PDGF i VEGF wykazują wiele podobieństw strukturalnych i funkcyjnych, zawierając fragmenty silnie konserwatywne w całym królestwie zwierząt. Najnowsze badania wskazują, że PDGF-y wiążą się nie tylko ze swoimi receptorami ale również z bardzo dużym powinowactwem do receptorów VEGFR1/2. Badania m.in. naszej grupy pokazały, że jedynie fragment pętli wiążącej PDGF-B, nie tylko wykazuje powinowactwo do receptorów PDGF  $\alpha/\beta$ , VEGFR2, ale również przyspiesza epitalizację rany w modelu mysim. Mimo ciekawych efektów, peptydy te nie są jednak tak skuteczne jak natywne białko PDGF-BB.

Dlatego, biorąc pod uwagę podobieństwa strukturalne i sekwencyjne wymienionych czynników wzrostu oraz mechanizm aktywacji ich receptorów poprzez dimeryzację, naszym celem jest otrzymanie nowych związków o strukturze dimerów, naśladujących naturalny mechanizm działania. W tym celu zaprojektujemy i otrzymamy, pulę związków opartych o pojedyncze pętle wiążące czynników tj. PDGF-A/B/C/D oraz VEGF-A/B/C/D. Racjonalizację w projektowaniu oprzemy o analizy strukturalne/sekwencyjne i modelowanie molekularne, z wykorzystaniem dostępnych struktur krystalicznych kompleksów PDGF $\beta$ :PDGF-BB i VEGF1:VEGF-AA. Następnie, pula nowych związków zostanie przebadana pod kątem ich wiązania do receptorów PDGFR $\alpha,\beta$  oraz VEGFR1,2 (testy ELISA), a ich potencjał stymulujący określony wstępnie na hodowlach komórek skórných (fibroblasty/keratynocyty). Najbardziej obiecujące peptydy zostaną również przebadane pod kątem stabilności proteolitycznej w ludzkim serum, a struktura kilku z nich określona za pomocą spektroskopii NMR (oraz CD). Wyniki te zostaną wykorzystane do ponownego projektowania nowych peptydów i peptydomimetyków w oparciu o modelowanie molekularne, w sprzężeniu z wynikami biologicznymi. Nowa pula związków zostanie znów przebadana (ELISA, linie komórkowe), a powinowactwo kilku z nich do receptorów określona za pomocą MST. Najbardziej obiecujące związki zostaną otrzymane w formie homo- i heterodimerów (również w układzie np. PDGF-B/VEGF-A) połączonych ze sobą za pomocą łączników PEG w reakcji typu „chemia klik”. Potencjał stymulujący dimerów zostanie określony na liniach komórkowych (proliferaacja, migracja, toksyczność, chemotaksja) oraz na liniach pierwotnych izolowanych z pacjentów zdrowych i chorych na cukrzycę. Linie pierwotne zostaną również przebadane pod kontem ekspresji receptorów PDGF i VEGF by móc skorelować ich obecność z aktywnością związków na liniach komórkowych. Dodatkowo, wybrane dimery zostaną przebadane pod kontem potencjału aktywacji fosforylacji receptorów VEGF i PDGF oraz głównych szlaków z nimi związanych (MAPK, ERK1/2 itp.), za pomocą technik typu western blot i ELISA.

Efektom niniejszego projektu będzie otrzymanie nowego typu, potencjalnych stymulatorów gojenia ran, które dzięki budowie dimerycznej, mają szansę naśladować naturalny mechanizm aktywacji receptorów czynników wzrostu. Tego typu podejście w projektowaniu stymulatorów gojenia ran jest unikatowe i dotąd nie opisane w literaturze. Weryfikacja tego modelu będzie niezwykle cenne, i może być wykorzystany do projektowania leków nowej generacji.