

KATARZYNA KUBICA

Streszczenie pracy doktorskiej zatytułowanej:

„**Characterization of small-molecule antagonists for oncogenic proteins Mdm2 and Hub1**”

Przedmiotem badań zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej było poszukiwanie małowcząsteczkowych inhibitorów oddziaływań MDM2/p53 oraz Hub1/Snu66, które w przyszłości mogłyby zostać zastosowane, jako leki w niegenotoksycznej terapii przeciwnowotworowej.

Białko p53, tak zwany strażnik genomu, odgrywa kluczową rolę w procesie ochrony organizmu przed nagromadzeniem mutacji spowodowanych czynnikami stresowymi takimi jak: uszkodzenie DNA, niedotlenienie czy też nieprawidłowe sygnały proliferacyjne. Może ono działać poprzez blokowanie cyklu komórkowego w celu dokonania naprawy genomu lub w przypadku nieodwracalnych uszkodzeń indukować naturalną śmierć komórki – apoptozę. Aktywność białka p53 jest naturalnie regulowana poprzez wytworzenie kompleksu z białkiem MDM2, na skutek, czego następuje jego eksport do cytoplazmy lub proteosomalna degradacja. W wielu typach nowotworów występuje nadekspresja białka MDM2, prowadząca do zahamowania aktywności p53, a co za tym idzie namnażania się nieprawidłowo funkcjonujących komórek i wytworzenia nowotworu.

Nowoczesne przeciwnowotworowe strategie terapeutyczne opierają się, zatem na zastosowaniu małowcząsteczkowych inhibitorów oddziaływania p53-MDM2, które wiążąc się z białkiem MDM2, powodują uwolnienie z kompleksu białka p53 oraz jego ponowną aktywację. Badania nad poszukiwaniem małowcząsteczkowych inhibitorów białka MDM2 rozpoczęto od optymalizacji struktury znanego wcześniej antagonisty MDM2: WK23 (Popowicz et al., 2010). Przeprowadzono szereg jego modyfikacji z zastosowaniem reakcji wieloskładnikowych (reakcja van Leusena) prowadzących do otrzymania dwunastu związków, których powinowactwo względem kieszeni wiążącej białka MDM2 zostało przetestowane za pomocą polaryzacji fluorescencyjnej (FP) oraz spektroskopii NMR. Kilka spośród badanych związków wykazało stałą inhibicji o niższej wartości niż wyjściowy związek WK23, co oznacza większe powinowactwo do kieszeni wiążącej MDM2, jednak najlepszym z nich okazał się być inhibitor **KH1**. Z tego względu to właśnie on został poddany dalszym modyfikacjom. W konsekwencji otrzymano związek **KH25**, który w badaniach z użyciem linii komórkowych wykazał zdolność do aktywowania białka p53. Dodatkowo struktura krystaliczna kompleksu MDM2/**KH25** pozwoliła na przeanalizowanie sposobu interakcji pomiędzy **KH25** a kieszenią wiążącą białka MDM2. Okazało się, że związek ten powoduje dimeryzację białka. Ze względu na fakt, że tego typu oddziaływania były opisane do tej pory w literaturze naukowej tylko raz, przeprowadzono dwa dodatkowe eksperymenty (oparte na: spektroskopii NMR oraz sączeniu

molekularnym), które pozwoliły potwierdzić, że analiza struktury krystalicznej jest słuszna a powstały dimer występuje także w roztworze.

Druga część badań dotyczyła poszukiwania inhibitorów niekanonicznego białka Hub1 (UBL5), które niedawno zostało scharakteryzowane jako czynnik kontrolujący alternatywny splicing poprzez niekwalencyjne oddziaływanie z domeną HIND spliceosomalnego białka Snu66 (Mishra et al., 2011; Ammon et al., 2014). Ze względu na fakt, że nieprawidłowości w alternatywnym splicingu mogą powodować wiele chorób takich jak: hipercholesterolemię, przedwczesne starzenie, choroby neurodegradacyjne czy też nowotwory, znalezienie małowzrostkowych inhibitorów oddziaływania Hub1/Snu66 pozwoliłoby nie tylko na lepsze zrozumienie sposobu działania białka Hub1 ale też mogłoby być początkiem nowej przeciwnowotworowej terapii.

Do tej pory, w literaturze naukowej nie został opisany żaden związek, który wykazywałby powinowactwo względem białka Hub1, pierwszym krokiem w drodze do znalezienia tego typu związków było, więc przeprowadzenie modelowania *in silico* z zastosowaniem programu AnchorQuery. Otrzymany wynik doprowadził do związków o rdzeniu 2-imidazoliny. Trzy z zaprojektowanych związków zostały zsyntezowane z zastosowaniem reakcji wieloskładnikowych typu Orru. Niestety, żaden z nich nie wykazał powinowactwa względem białka Hub1. Kolejnym krokiem było, więc przeprowadzenie tzw. fragment-based screening z zastosowaniem technik NMR (pomiar widm ^1H - ^{15}N SOFAST HMQC). Do tego celu użyto dwóch bibliotek związków: jednej niekomercyjnej złożonej z 500 małowzrostkowych fragmentów oraz drugiej komercyjnej z Helmholtz Zentrum München złożonej z 1500 fragmentów. Wyselekcjonowano dwadzieścia jeden związków, które wykazują powinowactwo do białka Hub1, a dla jednego z nich udało się ustalić stałą dysocjacji (1.97 mM).

Otrzymane w trakcie realizacji badań wyniki przyczyniły się do zwiększenia obecnej wiedzy na temat procesu dimeryzacji białka MDM2 (do tej pory opisanej w literaturze naukowej tylko raz: Graves et al. 2012) a także do wyselekcjonowania nowych inhibitorów białka MDM2 w tym związku **KH25**, który wykazuje dużą aktywność biologiczną. Dodatkowo poszukiwanie fragmentów wykazujących powinowactwo względem białka Hub1 doprowadziło do wyłonienia kilku struktur, które w wyniku dalszej optymalizacji mogłyby stać się efektywnymi inhibitorami białka Hub1.

Referencje:

- Ammon, T., Mishra, S.K., Kowalska, K., Popowicz, G.M., Holak, T.A. and Jentsch, S. (2014). The conserved ubiquitin-like protein Hub1 plays a critical role in splicing in human cells. *J. Mol. Cell Biol.* 6, 312-323.
- Graves, B., Thompson, T., Xia, M., Janson, C., Lukacs, C., Deo, D., Di Lello, P., Fry, D., Garvie, C., Huang, K.S., Gao, L., Tovar, C., Lovey, A., Wanner, J. and Vassilev, L.T. (2012). GravesActivation of the p53 pathway by small-molecule-induced MDM2 and MDMX dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 11788-11793.

Mishra, S.K., Ammon, T., Popowicz G.M., Krajewski, M., Nagel, R.J., Ares M.Jr., Holak, T.A. and Jentsch, S. (2011). Role of the ubiquitin-like protein Hub1 in splice-site usage and alternative splicing. *Nature* 474, 173-178.

Popowicz, G.M., Czarna, A., Wolf, S., Wang, K., Wang, W., Dömling, A. and Holak, T.A. (2010) Structures of low molecular weight inhibitors bound to MDMX and MDM2 reveal new approaches for p53-MDMX/MDM2 antagonists drug discovery. *Cell Cycle* 9, 1104-1111.