

Streszczenie pracy doktorskiej pt.: „Design and Synthesis of Inhibitors of the MDMX/p53 and USP2a/Ub Interactions”

Niniejsza rozprawa doktorska została poświęcona ważnym zagadnieniom dotyczącym małowcząsteczkowych antagonistów wybranych białek onkogennych: MDMX oraz USP2a. Tematyka zawartych w niej badań porusza istotny problem poszukiwań inhibitorów oddziaływań białko-białko o potencjale terapeutycznym. Możliwość zapobiegania nadmiernej aktywności białek USP2a i MDMX stanowiłaby cenny wkład w rozwój nowoczesnych, celowanych schematów chemioterapii.

Białko p53 jest jednym z ważniejszych czynników transkrypcyjnych o właściwościach korektorskich względem błędów powstałych w procesie replikacji DNA. P53 odgrywa ważną rolę podczas aktywacji szlaków metabolicznych prowadzących do zaprogramowanej śmierci komórki, czyli apoptozy. Wykazano, iż ze względu na występujące w p53 mutacje lub nadekspresje jego naturalnych antagonistów t.j białek MDM2 oraz MDMX, ta kluczowa dla utrzymania homeostazy w organizmie proteina jest nieaktywna, co stanowi jedną z ważniejszych przyczyn procesu nowotworzenia. Wieloletnie badania naukowe interakcji zachodzących między p53/MDMX oraz p53/MDM2 potwierdziły, iż inhibicja tych oddziaływań skutecznie przeciwdziała postępowi wielu typów chorób o podłożu nowotworowym.

Białko USP2a jest proteazą cysteinową, należącą do licznej rodziny proteaz ubikwitynospecyficznych (USP). Zadaniem protein z rodziny USP jest ratowanie innych białek, kierowanych na drogę degradacji proteasomalnej, poprzez usuwanie z ich powierzchni łańcuchów poliubikwitynowych. Wykazano, że wśród protein stabilizowanych w ten sposób przez białko USP2a znajdują się te, zaangażowane w procesy nowotworzenia, tj. cyklina D1, dająca komórkom nowotworowym zdolność ciągłej proliferacji, oraz wspomniane już supresory p53; MDM2 i MDMX. Nadekspresję USP2a zaobserwowano w wielu przypadkach chorób nowotworowych, co związane jest z jego właściwościami onkogennymi jako specyficznego aktywatora cykliny D1. Ze względu na zależność wielu rodzajów nowotworów od poziomu ekspresji cykliny D1, USP2a może być bardzo ważnym celem w projektowaniu nowoczesnych terapii antynowotworowych.

Początkowe badania koncentrowały się głównie na poszukiwaniu małowcząsteczkowych inhibitorów białka MDMX, a ich głównym założeniem była synteza koniugatów kwasu litocholowego oraz 1,4,5-trójpodstawionych pochodnych imidazolu. Pracę badawczą w tym aspekcie zaplanowano w oparciu o doniesienia literaturowe na temat aktywności kwasu

litocholowego względem białek MDM2 oraz MDMX. Pomimo że badania aktywności otrzymanych związków chemicznych względem docelowego białka nie przyniosły oczekiwanych efektów, to w trakcie ich trwania zaobserwowano nieoczekiwany wpływ kwasu litocholowego na obniżenie poziomu cykliny D1. Wynik tych badań skorelowano z potencjalnym powinowactwem tego kwasu żółciowego do deubikwitynazy USP2a. Hipotezę tą potwierdziły wyniki *in vitro* oraz z użyciem linii komórkowych, przeprowadzone z wykorzystaniem zsyntetyzowanych prostych pochodnych kwasu litocholowego, w szczególności jego hydroksyamidu.

Dalsze badania biologiczne wskazały na niekompetencyjny charakter oddziaływań tych inhibitorów z USP2a, co w kontekście ograniczonych możliwości modyfikacji ich struktury stanowiło bodziec do kontynuacji prac, tym razem nad otrzymaniem w pełni syntetycznych sond chemicznych oddziaływujących z proteazą USP2a. Ze względu na brak struktur krystalicznych białka USP2a z małowcząsteczkowym ligandem oraz w stanie niezwiązany z ubikwityną, konieczne było posługiwanie się prostymi modelami komputerowymi dostarczającymi cennych informacji dla potrzeb procesu projektowania połączeń organicznych. Informacje strukturalne niezbędne do opracowania potencjalnych związków chemicznych zostały pozyskane w oparciu o strukturę kompleksu USP2a z ubikwityną. Początkowe schematy syntezy zostały oparte głównie o metodologię prowadzenia reakcji wieloskładnikowych. Negatywne wyniki badań aktywności pierwszej grupy związków o charakterze rozmaitych pseudopeptydów, mających naśladować interakcje łańcucha bocznego ubikwityny oraz brak możliwości weryfikacji modeli komputerowych doprowadził do poszukiwania „*de novo*” związków oddziaływujących z USP2a.

W wyniku uzyskanym w badaniu przesiewowym, wykonanym techniką STD NMR¹¹ udało się wyłonić aktywną względem USP2a cząsteczkę nazwaną STD1. Dalsza optymalizacja tej pochodnej 5-(2-tienylo)-3-izooksazolu doprowadziła do odkrycia jeszcze bardziej aktywnego związku chemicznego STDT ($IC_{50} = 3,3 \pm 1,1 \mu M$), który stał się podstawą dalszych modyfikacji mających na celu głównie podniesienie jego ograniczonej rozpuszczalności w roztworach wodnych. Niestety, ingerencja w strukturę STDT doprowadziła do produktów o niższej aktywności niż struktura wyjściowa. Należy jednak zauważyć, że opisane w niniejszej pracy badania nad cząsteczką STDT nie wyczerpują wszystkich możliwości jej potencjalnych modyfikacji, dlatego też pozostaje ona atrakcyjnym punktem startowym dla dalszych poszukiwań antagonistów oddziaływań USP2a-ubikwityna.