



Politechnika Wroclawska

Wroclaw, 23.05.2019

Dr hab. Łukasz Berlicki
Zakład Chemii Bioorganicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Wroclawska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wroclaw
lukasz.berlicki@pwr.edu.pl

Recenzja pracy doktorskiej mgr Mirosławy Czub, pt.: "Small-molecule inhibitors of CD44-hyaluronan and MDM2-p53 interactions"

Mgr Mirosława Czub wykonała pracę doktorską pod kierunkiem prof. Tadeusza Holaka w Zespole Biologii Chemicznej i Projektowania Leków Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Praca była realizowana w ramach dwóch grantów Narodowego Centrum Nauki (Maestro i Symfonia) kierowanych przez prof. T. Holaka i dotyczyła poszukiwania nowych inhibitorów hamujących oddziaływanie kwas hialuronowy-CD44 i MDM2-p53.

Tematyka podjętego przez Doktorantkę projektu badawczego dobrze wpisuje się w nurt poszukiwań małowcząsteczkowych związków przeciwnowotworowych, które są realizowane w Zespole kierowanym przez prof. T. Holaka od wielu lat. Specyficzne oddziaływanie małych cząsteczek z wybranymi białkami odpowiedzialnym za kontrolowanie procesów komórkowych może być skuteczną strategią hamowania rozwoju nowotworów. Wiele takich celów molekularnych zostało już dobrze poznanych a związki wiążące się do nich są w trakcie badań klinicznych lub zostały wprowadzone na rynek. Przykładem takiego dobrze przebadanego celu molekularnego jest białko MDM2. Badania inhibicji oddziaływania MDM2 z białkiem p53 zaowocowały bardzo dużą liczbą związków małowcząsteczkowych.

Drugi układ oddziałujących biocząsteczek: kwas hialuronowy-CD44 jest znacznie mniej poznany. W tym przypadku znalezienie skutecznych inhibitorów jest trudne ze względu na dużą powierzchnię oddziaływania i brak wyraźnej wnęki wiążącej. Należy podkreślić, że Doktorantka podjęła się zadania ważnego i ambitnego.

Mgr Mirosława Czub napisała pracę doktorską w języku angielskim dołączając dwustronicowe streszczenie w języku polskim. Doktorat jest relatywnie zwięzłym opracowaniem liczącym 103 strony i podzielony jest w sposób klasyczny na cel (1 strona), wstęp (26 stron), wyniki i dyskusję (36 stron) oraz materiały i metody (14 stron), stosowane skróty (4 strony) i referencje literaturowe. Warto podkreślić staranny i klarowny język pracy oraz dobry poziom edycji dokumentu. Rysunki są przygotowane starannie i znacząco ułatwiają zrozumienie tekstu. Niedociągnięcia edytorskie są nieliczne i nie wpływają na pozytywny odbiór pracy. Do głównych błędów edytorskich należą: a) brak spójnego systemu numeracji/oznaczania związków chemicznych. Na każdym schemacie jest zastosowany inny sposób wskazywania związków, co powoduje, że np.: związek o nr 1 jest na rysunku 8, a także w tabeli 3 i tabeli 4, ale za każdym razem jest to inna substancja. b) podpisy linii na chromatogramach są nieczytelne z powodu zastosowania czcionki o zbyt małym rozmiarze; c) prawie każda z tabel w pracy jest sformatowana w inny sposób; d) podpisy niektórych rysunków znajdują się na kolejnych stronach.

Wstęp rozprawy doktorskiej mgr Mirosławy Czub jest dobrze przemyślanym i spójnym wprowadzeniem do prezentowanej tematyki badawczej. Największą część wstępu zajmuje opis białka CD44, jego ligandów i znaczenia w rozwoju nowotworów. Dodatkowo Doktorantka poświęca kilka stron oddziaływaniu MDM2/p53 i jego inhibitorom. Natomiast krótki podrozdział dotyczący testów przesiewowych fragmentów (fragment-based drug discovery) nie wydaje się być potrzebny we wstępie do tej pracy doktorskiej, ponieważ jest to tylko jedna z metodologii użytych przez Doktorantkę a jej opis w tym miejscu jest bardzo ogólny.

Rozdział 'Wyniki i dyskusja' opisuje poszukiwania nowych ligandów dla białka CD44 oraz próby modyfikacji ligandów białka MDM2 przy użyciu kwasu hialuronowego. Niewątpliwie, opisywane badania są szeroko zakrojonym projektem, w którym wykorzystano bogate spektrum metod eksperymentalnych. Jednakże analiza zawartych w pracy podziękowań oraz rozdziału materiały i metody wskazuje, że nie wszystkie eksperymenty Doktorantka wykonywała osobiście. Taka sytuacja jest oczywiście nieunikniona w wieloosobowych zespołach pracujących nad ambitnymi projektami, jednakże w rozprawie

doktorskiej zakres prac Doktorantki powinien być jednoznacznie zdefiniowany, a przy opisach wyników uzyskanych przez lub przy pomocy współpracowników powinny pojawić się odpowiednie notatki. Bardzo proszę Doktorantkę, aby w ramach prezentacji w czasie obrony niniejszego doktoratu jednoznacznie zaznaczyła wyniki otrzymane przez współpracowników.

Pierwsza część 'Wyników i dyskusji' dotyczy otrzymania białka CD44, które było niezbędne do dalszych badań. Ekspresjonowano cztery konstrukty białka CD44 w wersji znakowanej ^{15}N lub bez znakowania. Niestety z opisu nie wynika jasno, czy otrzymano czyste białka dla wszystkich 4 konstruktów. Co więcej, nie jest jasne, czy ekspresja takich konstruktów białka CD44 była już opisana w literaturze.

Następny podrozdział opisuje analizę NMR sposobu wiązania czterech związków do białka CD44, które były wyselekcjonowane na podstawie testów przesiewowych biblioteki 1500 fragmentów. Na podstawie miareczkowania białka CD44 tymi związkami wyznaczono ich stałe wiązania, które były w zakresie 0.66-2.56 mM. Analiza przesunięć sygnałów na widmach NMR pozwoliła także wskazać reszty, których przesunięcia chemiczne były zaburzone podczas wiązania ligandów. Ponieważ, reszty te znajdują się w odległych rejonach białka, sposób ich wiązania pozostaje niejasny. Co może być przyczyną takiego wyniku tych eksperymentów? Następnie przetestowano dodatkowo 13 związków o strukturze zbliżonej do tych znalezionych w testach przesiewowych, ale widma NMR nie wykazały wiązania żadnego z nich do celu molekularnego.

Związki z badań przesiewowych były także przetestowane przez analizę zmiany temperatury topnienia celu molekularnego. Większość badanych związków wykazała efekt destabilizujący białko w przeciwieństwie do kwasu hialuronowego, który je stabilizuje. W tym fragmencie brakuje dyskusji – czy i w jakim zakresie taki wynik świadczy o wiązaniu związków do CD44?

Doktorantka przeprowadziła także analizę kompetycyjności wiązania odkrytych związków do białka CD44 względem kwasu hialuronowego z użyciem spektroskopii NMR. Wykazano, że związek S873 wiąże się niezależnie od kwasu hialuronowego natomiast związek S638 konkuruje z kwasem hialuronowym. Jak można skomentować ten wynik w kontekście perturbacji przesunięć chemicznych wykazywanych przez S873, S638 i kwas hialuronowy?

Podjęte zostały także próby krystalizacji białka CD44, które doprowadziły do

otrzymania kryształów białka w formie apo, zdolnych do rozpraszania promieniowania X. Struktura białka została rozwiązana, jednakże była już ona opisana wcześniej w literaturze. Pomimo nieosiągnięcia założonego celu – struktury kompleksu CD44 z inhibitorem należy podkreślić znaczący wysiłek Doktorantki włożony w otrzymanie struktury krystalicznej białka.

Ostatni fragment rozdziału „Wyniki i dyskusja” dotyczy prób syntezy koniugatów kwasu hialuronowego i wybranych inhibitorów oddziaływania MDM2/p53. Niestety ze względu na duże skomplikowanie chemii kwasu hialuronowego, nie udało się uzyskać pożądaných produktów.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Mirosławy Czub zawiera wiele cennych wyników a w ich uzyskanie Doktorantka włożyła wiele pracy. Co więcej, opisywane badania miały charakter multidyscyplinarny, co udowadnia szeroką wiedzę i umiejętności Doktorantki. Dyskutowana rozprawa spełnia bez wątpienia ustawowe i zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Mirosławy Czub do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Juhon Berticchi