



Instytut Farmakologii
Polskiej Akademii Nauk

ul. Smętna 12
31- 343 Kraków
tel.: 12 662 32 20
fax: 12 637 45 00
www.if-pan.krakow.pl

Sekretariat Dyrekcji
tel.: 12 662 32 05
tel.: 12 662 32 49
e-mail: ifpan@if-pan.krakow.pl

Kraków, 14 maja 2019

Recenzja
pracy doktorskiej mgr Mirosławy Czub pod tytułem:
„Small-molecule inhibitors of CD44-hyaluronan and MDM2-p53 interactions”
wykonanej pod kierunkiem prof. Tadeusza Holaka
w Zespole Biologii Chemicznej i Projektowania Leków na Wydziale Chemii Uniwersytetu
Jagiellońskiego

Glikoproteina CD44 – cel molekularny badań przedstawionych w pierwszej części rozprawy – jest białkiem wielofunkcyjnym, ważnym receptorem dla składników macierzy, takich jak kwas hialuronowy, osteopontyna, fibronektyna czy kolagen. Ze względu na wysokie powinowactwo do składników macierzy zewnątrzkomórkowej odgrywa kluczową rolę w interakcjach macierz-komórka. Najnowsze badania pokazują znaczącą rolę białka CD44 w migracji komórek nowotworowych, które charakteryzują się dużą ilością CD44 na swojej powierzchni. Co więcej, udokumentowano że wzrost ekspresji tego antygenu pojawia się wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania choroby nowotworowej, co zostało wykorzystane w medycynie i poziom antygenu CD44 uważa się obecnie za marker przerzutowania. Dlatego badania nad inhibitorami białka CD44 są istotne i wpisują się w aktualny nurt badań nad poszukiwaniem nowoczesnych terapii celowanych.

Druga część pracy, obejmująca badania nad inhibitorami białka MDM2, które jest E3 ligazą ubikwityny i prowadzi do degradacji supresor nowotworów – białko p53, to obecnie mocno rozwijany kierunek badań, dobrze udokumentowany w literaturze. Podjęte przez mgr Mirosławę Czub badania dotyczą innowacyjnego podejścia mającego zwiększyć rozpuszczalność i transport znanych już inhibitorów MDM2 do komórek nowotworowych.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Mirosławy Czub została napisana w języku angielskim; zawiera 103 strony maszynopisu. Praca ma strukturę klasyczną i zawiera następujące części: streszczenia w języku angielskim i polskim, cel pracy, wstęp teoretyczny, opis otrzymanych wyników wraz z dyskusją oraz szczegółowy opis metodologiczny przeprowadzonych eksperymentów. Na końcu pracy znajduje się spis skrótów i cytowanej literatury oraz załącznik zawierający sekwencje aminokwasowe konstruktów białka CD44.

Cele pracy zostały zwięźle sformułowane jako znalezienie niskocząsteczkowych inhibitorów

oddziaływania białka CD44 z kwasem hialuronowym oraz opracowanie nowych koniugatów inhibitorów oddziaływania białko-białko MDM2-p53.

Praca posiada rozbudowany wstęp teoretyczny, obejmujący charakterystykę białka CD44 oraz kwasu hialuronowego (HA), jako naturalnego liganda tego białka, opis oddziaływania CD44-HA oraz krótki przegląd literaturowy modyfikacji kwasu hialuronowego wraz z zastosowaniem jego pochodnych. Następnie przedstawiono znaczenie białka CD44 w procesie nowotworowym oraz przegląd znanych z literatury inhibitorów. W dalszej części znajduje się opis oddziaływania białek MDM2-p53 oraz podział i charakterystyka opublikowanych do tej pory inhibitorów białka MDM2, z naciskiem na cząsteczki bezpośrednio wykorzystane w badaniach Autorki. W ostatnim podrozdziale, znajduje się krótkie objaśnienie koncepcji opracowania koniugatów inhibitorów białka MDM2 z kwasem hialuronowym.

Część wstępna umiejętnie wprowadza w tematykę badań i podaje wszystkie informacje potrzebne do śledzenia i zrozumienia otrzymanych wyników.

Wyniki pracy doktorskiej zostały przedstawione w sposób logiczny i zwięzłe acz wystarczająco opisują oraz ilustrują przeprowadzone badania. Doktorantka opisała ekspresję i sposób oczyszczania białka CD44 z ciałek inkluzyjnych, wymagający renaturacji białka. Oczyszczone białko scharakteryzowała metodami elektroforetycznymi oraz za pomocą widm NMR. W dalszym etapie, otrzymane białko zostało wykorzystane w badaniach NMR ^1H - ^{15}N SOFAST HMQC do przeskanowania biblioteki składającej się z 1500 niskocząsteczkowych związków. Doktorantka przedstawiła struktury czterech „hitów”, wykazujących wiązanie do badanego białka, dla których następnie wyznaczyła wartości stałych dysocjacji z eksperymentów z różnymi stężeniami związków. Następnie, na podstawie analizy różnic w przesunięciach sygnałów na widmach NMR wykazano, że związki S873, S898 i S936 oddziałują z CD44 w innym miejscu niż związek S638. Wykorzystując dane literaturowe, Autorka przypisała sygnały wykazujące przesunięcia na widmach NMR do poszczególnych aminokwasów, w celu scharakteryzowania miejsca ich wiązania. Warto zwrócić uwagę na kontrolne eksperymenty pokazujące wpływ DMSO, stosowanego do rozpuszczania związków, na przesunięcia sygnałów NMR badanego białka. Doktorantka przebadala metodą NMR i metodą oznaczenia przesunięcia termicznego (TSA) 13 dodatkowych związków, strukturalnie zbliżonych do znalezionych w teście skринingowym. Pomimo niewielkich zmian zaobserwowanych w przesunięciach wartości temperatury topnienia w teście TSA, żaden z dodatkowych związków nie wykazał oddziaływania z CD44 w badaniach NMR.

W dalszej części pracy Doktorantka przedstawiła próby krystalizacji białka CD44 w formie apo, jak również w postaci kompleksu z oktamerem kwasu hialuronowego. Celem krystalizacji białka

apo-CD44 było, w kolejnym etapie, nasączenie otrzymanych kryształów przy pomocy odkrytych związków. Ponieważ struktura apo-CD44 została otrzymana dopiero pod koniec realizacji pracy, przeprowadzone w późniejszej ograniczonej próbie nie doprowadziły do otrzymania kryształów kompleksów.

W kolejnej części pracy Doktorantka opisała trawienie wielkocząsteczkowego kwasu hialuronowego i oczyszczanie otrzymanych oligosacharydów. Oktamer kwasu hialuronowego zastosowano do dalszej analizy oddziaływania odkrytych związków, przeprowadzając testy NMR przy użyciu kompleksu CD44-HA₈. Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły na potwierdzenie różnic wynikających z dwóch miejsc wiązania się związków, oraz wskazania, że **S638** wiąże się w kieszeni wiążącej kwas hialuronowy, o czym świadczył brak zmian w widmach wspomnianego kompleksu, natomiast **S873** oddziałuje w miejscu poza tą kieszenią. Przedstawione w tej części rozprawy doktorskiej badania zostały opublikowane w czasopiśmie naukowym: *Bioorganic Chemistry*.

Dalsza część pracy obejmuje próby syntezy koniugatów oktameru kwasu hialuronowego ze związkami, których oddziaływanie z białkiem MDM2 zostało już wcześniej opublikowane w czasopiśmie naukowym: *Journal of Medicinal Chemistry*, w którym Doktorantka jest jedynym z Autorów. Celem syntezy wspomnianych koniugatów było zwiększenie rozpuszczalności i dostępności inhibitorów w komórkach. Przedstawione metody syntezy opierały się na znanych w literaturze procedurach, stosowanych przy otrzymywaniu związków będących modyfikacjami oligosacharydów kwasu hialuronowego. Doktorantka przedstawiła widma NMR potwierdzające otrzymanie związku HA₈-ADH (ADH – dihydrazyd kwasu adypinowego, używany jako linker), natomiast dalsze syntezy z jego wykorzystaniem nie doprowadziły do otrzymania docelowych połączeń z inhibitorami MDM2. W pracy Autorka przedstawiła alternatywną drogę syntezy ww. koniugatów, również bez pozytywnych wyników.

Część eksperymentalna szczegółowo opisuje stosowane metody oraz warunki prowadzenia eksperymentów, jednak brakuje mi pełnej dokumentacji (np. w formie elektronicznej) wszystkich pomiarów – w pracy zamieszczono tylko widm NMR z doświadczeń miareczkowania (brakuje ich dla **S898** i **S936**), a krzywe titracyjne pokazano z kolei dla **S936** i **S638**). Dodatkowo, krzywa dla **S638** z doktoratu (Fig. 22B) różni się od tej z pracy w *Bioorganic Chemistry* (Fig. 3B), co zapewne jest błędem technicznym polegającym na wklejeniu innego wykresu. Uważam również, że dane dotyczące przesiewanej biblioteki są zdecydowanie niewystarczające – w doktoracie wymieniono tylko liczbę związków, a dopiero z publikacji można się dowiedzieć, że użyto bazy Maybridge Ro3 diversity fragment library. Co ciekawe, ta sama biblioteka była wykorzystana w pracy Liu z 2014

roku (o czym wspomniano na str. 27) – czy wtedy zidentyfikowane związki zostały również potwierdzone w eksperymencie skringowym przeprowadzonym przez Doktorantkę (związki 1 i 4 z Fig. 8 są bliskimi analogami S638)? Skoro dostępne są kryształy związków 1 i 4 z CD44, to czy wyniki NMR potwierdzają podobne położenie związku S638 w kieszeni wiążącej? Z kolei związki bisarylowe (S873, S898 i S936) są analogami związków znalezionych w bazie Maybridge Ro3 przez Baggio et al. Uważam, że porównanie wyników z prac innych zespołów z nowo otrzymanymi byłoby cennym uzupełnieniem rozprawy, umożliwiającym wyciągnięcie bardziej precyzyjnych wniosków dotyczących wymagań strukturalnych dla ligandów CD44. Czy na podstawie wspomnianych wyżej prac i badań własnych Doktorantki można twierdzić, że praktycznie tylko te dwa rodzaje fragmentów spośród 1500 mają zdolność oddziaływania z CD44? Intrygujące są również negatywne wyniki dla 13 strukturalnie zbliżonych, do tych znalezionych w skringingu, związków. Wydaje mi się, że szczegółowa analiza struktura-aktywność, wsparta modelowaniem oddziaływań badanych związków w potencjalnych miejscach wiążących CD44 mogłaby wskazać możliwe przyczyny.

Pewien niedosyt pozostawia przedstawienie i analiza wyników eksperymentów TSA, którym poświęcono tylko dwie strony. Oczekiwałby choćby drobnego komentarza dotyczącego rozbieżności pomiędzy wynikami NMR i TSA.

Uwagi techniczne:

- S37: „The green signal represent...”
- S46: W podpisie Fig. 21A zapewne powinno być S873 zamiast S936
- S49: „...these signals move them...”
- S50: szkoda, że na Fig. 24 nie podpisano wyróżnionych kolorem aminokwasów
- S87: „For the preliminary screening the compounds were added in molar ratios compound to protein 1:1 and 1:10 and ¹H NMR spectra were measured.” – czy na pewno stosunek jest odpowiedni?
- S89: „AcOH- ethanol” !
- S90: „NoLS- Nuclear localization signal”

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Mirosławy Czub podejmuje trudną tematykę, poszukiwania związków oddziałujących z białkiem CD44. Ze względu na duże znaczenie białka CD44 w procesach komórkowych i stosunkowo ubogą literaturę dotyczącą inhibitorów, wszelkie nowe dane oraz kontynuowanie badań są bardzo istotne. Nowe małowcząsteczkowe ligandy CD44 znalezione przez Doktorantkę mogą posłużyć do dalszego rozwoju inhibitorów tego białka. Synteza koniugatów, ze znanymi inhibitorami białka MDM2 charakteryzuje się wysokim stopniem innowacyjności. Syntezy związków o tak rozbudowanych strukturach są dość trudne, a potwierdzenie

struktury otrzymanych produktów może być również problematyczne. Niewątpliwie, przeprowadzone doświadczenia stanowią punkt startowy do dalszych badań. Uważam, że należy docenić wszechstronność Doktorantki, która w pracy posługiwała się wieloma różnorodnymi technikami: biologii molekularnej, krystalizacji białek, syntezy chemicznej oraz pomiaru i analizy widm NMR i TSA dla białek i ich kompleksów. Dodatkowo, prezentowane wyniki zostały już częściowo opublikowane w uznanych czasopismach. Praca, mimo iż nie zawsze zakończona pełnym sukcesem, stanowi solidne podstawy do dalszego rozwoju nowych inhibitorów CD44 i koniugatów inhibitorów MDM2.

W związku z powyższym, stwierdzam, że przedłożona do oceny praca doktorska mgr Mirosławy Czub spełnia ustawowe wymagania i zwracam się do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A. Bojda