



Wroclaw, 11.05.2017

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

Recenzja pracy doktorskiej mgr Katarzyny Guzik, pt.: "Design, synthesis and application of small-molecule probes that interact with tumorigenic proteins: Mdm2, programmed cell death protein 1 and programmed cell death ligand 1"

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Katarzyny Guzik została wykonana pod opieką prof. dr. Tadeusza Holaka. W rozprawie opisane zostały poszukiwania małowcząsteczkowych inhibitorów dwóch oddziaływań białko-białko, które powiązane są z rozwojem nowotworów. Cząsteczki o takiej aktywności są więc potencjalnymi kandydatami na leki przeciwnowotworowe.

Oddziaływanie p53-MDM2/X jest badane od wielu lat. Jednoznacznie wykazano, że jego inhibicja może prowadzić do zahamowania rozwoju nowotworu. Dlatego też jest to bardzo atrakcyjny cel molekularny. Do tej pory odkryto dużą liczbę małowcząsteczkowych inhibitorów tego oddziaływania, z pośród których niektóre struktury są na etapie badań klinicznych.

Historia studiów nad oddziaływaniem PD1-PDL1 jest krótsza, jednakże bardzo owocna. Do praktyki klinicznej wprowadzono przeciwciała monoklonalne o właściwościach inhibitorowych względem PD1-PDL1, które wykazują niezwykle wysoki potencjał

przeciwnowotworowy. To odkrycie stymuluje poszukiwania związków małowcząsteczkowych o takiej aktywności, jednakże do tej pory opublikowano stosunkowo małą liczbę takich cząsteczek. Należy więc stwierdzić, że tematyka podjęta przez Doktorantkę jest bardzo ciekawa a badania w tym zakresie mogą przynieść ważne odkrycia.

Rozprawa doktorska (123 strony) mgr Katarzyny Guzik jest napisana w języku angielskim. Zgodnie z klasycznym układem prac naukowych została podzielona na wstęp literaturowy, wyniki, podsumowanie, materiały i metody oraz spis literatury. Dodatkowo pracę uzupełniono o streszczenie w języku polskim i angielskim. Praca jest napisana bardzo starannie i zilustrowana szeregiem kolorowych, dobrze przygotowanych rysunków. Usterki edytorskie są nieliczne i niewarte odnotowania.

Wstęp jest relatywnie krótki (9 stron) i zbiera podstawowe informacje dotyczące powiązania oddziaływań PD1-PDL1 oraz p53-MDM2 z rozwojem nowotworów. Przedstawione zostały także możliwości wykorzystania tych białek jako celów molekularnych dla kandydatów na leki przeciwnowotworowe. Jednakże struktury białek, sposób ich oddziaływania między sobą jak i ze znanymi inhibitorami zostały przedstawione dosyć pobieżnie. Dodanie takich danych pozwoliłoby na lepsze zrozumienie przedstawionych w rozprawie wywodów.

Część pracy dotycząca wyników badań jest podzielona na dwie części odpowiadające poszukiwaniom inhibitorów dwóch oddziaływań: PD1-PDL1 oraz p53-MDM2. Początkowo, Doktorantka próbuje poszukiwać inhibitorów PD1-PDL1 z zastosowaniem metod wspomaganych komputerowo (program Anchor Query). Zaprojektowane związki zostały zsyntezowane, ale nie wykazywały aktywności inhibitorowej. W tym przypadku warto byłoby przeanalizować modele wygenerowane przez program Anchor, aby zrozumieć przyczyny braku aktywności otrzymanych związków.

Następnie Doktorantka syntezuje wybrane związki z patentu Bristol-Myers-Squibb w celu dokładniejszego poznania sposobu ich oddziaływania z białkiem. Ta część jest niezwykle owocna ponieważ przynosi informacje strukturalne o nietypowym sposobie wiązania inhibitorów do celu molekularnego. Wykazano, że tworzą się kompleksy o stechiometrii 2:1, białko:ligand. W celu znalezienia nowych aktywnych inhibitorowo struktur przeprowadzono następnie testy przesiewowe 1500 związków, z których tylko jeden wykazywał wiązanie do białka. Następnie przetestowano 8 pochodnych znalezionej aktywnego związku oraz dużą grupę pochodnych bifenylowych. Wśród analizowanych cząsteczek kilka wykazywało

wiązanie do celu molekularnego, jednakże bardziej szczegółowe badania nie zostały przeprowadzone.

W drugiej części pracy Doktorantka opisała szereg pochodnych znanego inhibitora oddziaływania p53-MDM2 – związku WK23. Otrzymano i zbadano względem białek MDM2 i MDMX 19 pochodnych. Co ważne, niektóre z tych związków wykazywały bardzo wysoką, nanomolarną aktywność inhibitorową względem MDM2. W większości przypadków aktywność względem MDMX była ok. 3 rzędy słabsza.

Poza wyżej wymienionymi uwagami chciałbym poprosić Doktorantkę o przedyskutowanie w czasie obrony następujących problemów:

1. Poszukiwania nowych inhibitorów oddziaływania PD1-PDL1 zakończyły się na wskazaniu dwóch grup związków – pochodnych STD4 i związków bifenylowych, które wiążą się do celu molekularnego. Jaka ścieżka dalszego postępowania byłaby najbardziej obiecująca dla znalezienia wysokoaktywnego inhibitora? Jakie są potencjalne możliwości modyfikacji wyżej wspomnianych związków?
2. Czy wyniki eksperymentalne (w szczególności widma NMR) dla związku STD4 i jego pochodnych mogą wskazywać jego potencjalne miejsce wiązania do białka?
3. Czy można wskazać przyczynę zdecydowanie mniejszej aktywności inhibitorowej związków KH względem MDMX w porównaniu do MDM2? Czy wykonano dokowanie któreś z tych pochodnych do MDMX?
4. Jak można wytłumaczyć bardzo znaczące zwiększenie aktywności inhibitorowej związku KH1 względem struktury wyjściowej WK23? Wprowadzenie atomu fluoru powoduje obniżenie stałej inhibicji o dwa rzędy (odpowiednio $K_i = 916$ nM i 6 nM dla WK23 i KH1).
5. Otrzymano pochodne KH1, które zawierały długie łańcuchy alifatyczne (związki KH21-23) jako potencjalne elementy koniugatów z innymi cząsteczkami. Jakie związki mogłyby być dołączone w celu zwiększenia efektu terapeutycznego?

Podsumowując należy podkreślić, że dyskutowana rozprawa doktorska zawiera kilka ważnych odkryć naukowych, które mogą przyczynić się do znalezienia związków o znaczącym potencjale przeciwnowotworowym. Rozprawa potwierdza także dużą wiedzę autorki i umiejętność prowadzenia pracy naukowej. Co więcej, opisane wyniki wymagały dużego nakładu pracy eksperymentalnej.

Podsumowując, stwierdzam z pełnym przekonaniem, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Katarzyny Guzik spełnia 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 Katarzyny Guzik do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

J. Bielecki