

**WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII**

ZAKŁAD INŻYNIERII BIAŁKA

ul. Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław | Poland

tel. +48 71 375 28 89

www.biotech.uni.wroc.pl

Prof. Jacek Otlewski

Wrocław, 27 kwietnia 2017 r.

Ocena pracy doktorskiej mgr Katarzyny Guzik zatytułowanej „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”

Wiodącym nurtem współczesnej biotechnologii medycznej jest specyficzne blokowanie oddziaływań makrocząsteczek, najczęściej typu białko-białko, z zastosowaniem bądź przeciwciał, bądź związków niskocząsteczkowych. W szczególności, rozdysocjowanie niektórych z kluczowych dla funkcjonowania komórki rakowej oddziaływań okazało się skuteczną metodą terapii przeciwnowotworowej. Proces poszukiwania antagonistów oddziaływań białko-białko jest jednak żmudny i mimo przeznaczenia na badania znacznych środków finansowych opracowywanie nowych leków przez światowe koncerny farmaceutyczne przebiega stosunkowo wolno.

Zespół prof. Holaka posiada wieloletnie doświadczenie w syntezie antagonistów oddziaływań białko-białko, szczególnie kompleksu p53-Mdm2/MdmX. Praca doktorska mgr Katarzyny Guzik, zrealizowana w grupie prof. Holaka, nawiązuje do wcześniejszych badań nad inhibitorami oddziaływania p53-Mdm2, a także podejmuje nowe wezwanie w postaci poszukiwania antagonistów oddziaływania pomiędzy receptorem programowanej śmierci PD-1 a jego ligandem PD-L1. Kompleks p53-Mdm2 jest od lat rozpoznany celem molekularnym, uważany za kluczowy dla opracowania szeroko stosowanej terapii przeciwnowotworowej z użyciem niskocząsteczkowych antagonistów. Z kolei kompleks białek PD-1 i PD-L1 odpowiada za zahamowanie proliferacji limfocytów T, wydzielanie cytokin oraz funkcji cytotoksycznych limfocytów, a jego zablokowanie z użyciem przeciwciał stanowi skuteczną metodę terapii przeciwnowotworowej. Bardzo nieliczne natomiast są badania w celu wykorzystania związków niskocząsteczkowych do zahamowania tego oddziaływania. Dlatego poszukiwanie takich cząsteczek wydaje się uzasadnione.

Praca doktorska mgr Katarzyny Guzik to napisany po angielsku maszynopis liczący 123 strony, podzielony na rozdziały *Introduction, Results, Conclusions and perspectives, Materials and methods, Literature refererences* oraz *Abbreviations*. Doktorat zawiera także liczne podziękowania, listę publikacji doktorantki oraz streszczenie w językach polskim i angielskim.

Wstęp, rozpoczyna się od określenia celów pracy doktorskiej, którymi są synteza i charakterystyka związków zdolnych do rozdysocjowania wspomnianych powyżej kompleksów białkowych. Następnie mgr Guzik opisuje oddziaływanie pomiędzy receptorem PD-1 a jego ligandem PD-L1. Kolejno doktorantka przedstawia kompleks p53-Mdm2, jego strukturę oraz znaczenie w biologii komórki, a także zestawia przykłady cząsteczek, które znajdują się we wczesnych fazach badań klinicznych. Rozdział ten jest krótki (tylko 9 stron), aczkolwiek treściwy i dobrze koresponduje z następującym po nim przedstawieniem wyników.

Omówienie uzyskanych przez doktorantkę wyników liczy 33 strony i jest podzielone na dwie części, dotyczące poszukiwania antagonistów oddziaływania PD-1/PD-L1 oraz MDM2/p53. Projektowanie i synteza związków chemicznych, które mogłyby oddziaływać z receptorem PD-1 zostało przeprowadzone z użyciem metody wirtualnego przeszukiwania antagonistów *Anchor Query*. Nie doprowadziła ona jednak do znalezienia odpowiednich struktur. Z kolei testy przesiewowe oparte na widmach NMR, które zostały wykonane we współpracy z dr. Grzegorzem Popowiczem z Centrum Helmholtza w Monachium, doprowadziły do znalezienia kilku fragmentów strukturalnych stanowiących podstawę do projektowania i syntezy antagonistów tego receptora.

W kolejnym rozdziale doktorantka zastosowała opatentowany przez firmę Bristol-Myers-Squibb rdzeń bifenylowy do syntezy pochodnych, które mogłyby oddziaływać z białkiem PD-L1. Związki wykazywały powinowactwo do PD-L1, co stwierdzono w jedno- i dwuwymiarowych heteronuklearnych widmach NMR i potwierdzono poprzez ustalenie struktur krystalicznych dla czterech kompleksów tych inhibitorów z białkiem PD-L1. Doktorantka zaobserwowała dimeryzację PD-L1 pod wpływem wiązania tych związków, zarówno w kryształach, jak i w roztworze z zastosowaniem technik NMR oraz chromatografii.

Duże znaczenie w poszukiwaniu małowcząsteczkowych inhibitorów białka PD-L1 mogą mieć także, opisane w podrozdziale 2.8, badania dotyczące poszukiwania innych aktywnych względem białka PD-L1 fragmentów strukturalnych. Przeprowadzone, w oparciu o testy przesiewowe z zastosowaniem spektroskopii NMR, badania biblioteki fragmentów zaowocowały odkryciem drugiej grupy związków o rdzeniu benzoksazynowym.

Dalsza część rozprawy zestawia wyniki poszukiwań antagonistów oddziaływania p53-Mdm2. Opierając się na wcześniej opisanym przez grupę prof. Holaka związku WK23 doktorantka zsyntetyzowała jego pochodne i zmierzyła powinowactwo względem Mdm2 z zastosowaniem polaryzacji fluorescencji oraz widm NMR. Co bardzo interesujące, związki KH1, KH7, KH8, KH19 oraz KH22 wykazywały bardzo niskie stałe dysocjacji w zakresie stężeń nanomolowych. Cząsteczki te zostały poddane testom na liniach komórkowych U2OS oraz HCT 116, wykazując zdolność do aktywacji białka p53 i akumulacji Mdm2 i p21, a także wpływając na zatrzymanie cyklu komórkowego.

Rozprawa zawiera szereg wyników stanowiących punkt wyjścia do optymalizacji struktur, które zostały odkryte w wyniku przeprowadzonych przez doktorantkę badań. Moje podstawowe pytanie dotyczy eksperymentów, które zostały samodzielnie przeprowadzone przez doktorantkę. Z obszernego opisu przeprowadzonych syntez (strony 53 do 112) wynika, że były to wszystkie syntezы chemiczne. Z kolei lista podziękowań (strona 4) jest na tyle obszerna, że prosiłbym o odpowiedź, jaki jest udział doktorantki w wykonaniu pomiarów NMR, krystalizacji i rozwiązaniu struktur, pomiarów polaryzacji fluorescencji, preparacji białek oraz testów komórkowych.

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Katarzyny Guzik zatytułowana „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” spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim a ujęte stosownymi przepisami. Wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Katarzyny Guzik do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

