



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 Katarzyny Kubicy, pt.: "Characterization of small-molecule antagonists for oncogenic proteins Mdm2 and Hub1"

Pani mgr Katarzyna Kubica wykonała pracę doktorską pod kierunkiem prof. dr Tadeusza Holaka dotyczącą małowcząsteczkowych antagonistów dwóch wybranych białek onkogennych: Mdm2 i Hub1. Tematyka badań Doktorantki doskonale wpisuje się w bardzo silny trend poszukiwania inhibitorów oddziaływań białko-białko o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym.

Badania nad białkiem p53 trwają już od wielu lat, a rola jego oddziaływania z MDM2 w rozwoju nowotworów jest stosunkowo dobrze poznana. Udowodniono, że inhibicja oddziaływania p53/MDM2 skutecznie hamuje rozwój wielu nowotworów. Ta wiedza skutecznie stymuluje badania małowcząsteczkowych inhibitorów oddziaływania p53/MDM2, które w okresie ostatnich 20 lat przyniosły znaczącą grupę efektywnych struktur. Wysoki potencjał terapeutyczny tego typu związków powoduje także znaczące zainteresowanie firm farmaceutycznych. Siedem inhibitorów oddziaływania p53/MDM2 znajduje się obecnie w 1 fazie badań klinicznych jako potencjalne leki przeciwnowotworowe.

Białko Hub1 jest znacznie słabiej poznane niż p53. Hub1 jest wysokokonserwatywnym białkiem o strukturze podobnej do ubikwityny, które kontroluje proces alternatywnego splicingu. Partnerem molekularnym Hub1 jest białko Snu66. Pomimo tego, że znana jest struktura krystaliczna kompleksu tych dwóch białek, do tej pory nie odkryto żadnych małowiązanych inhibitorów ich oddziaływania.

Praca doktorska mgr Katarzyny Kubicy liczy 102 strony i jest podzielona według klasycznego schematu na wstęp, wyniki i dyskusję, materiały i metody oraz odnośniki literaturowe. Tekst jest zilustrowany szeregiem starannie przygotowanych rysunków.

Wstęp zaczyna się od określenia celów pracy doktorskiej. Kolejno następuje krótkie omówienie podstawowych informacji dotyczących badanych celów molekularnych. Oddziaływanie p53/MDM2 i jego powiązanie z rozwojem nowotworów jest dobrze scharakteryzowane. Natomiast informacje o białku Hub1 wydają się być niewystarczające. Dlaczego Hub1 można nazwać białkiem onkogennym? Co więcej, rozdział dotyczący Hub1 powinien być podrozdziałem w 'Biological background of the research'. Skróceniowo są także omówione wybrane reakcje multikomponentowe (Orri, van Leusena i Ugi) oraz podstawy technik NMR służących do badania i poszukiwania małowiązanych ligandów białek.

Rozdział wyniki i dyskusja (23 strony) składa się z dwóch części dotyczących odpowiednio poszukiwań antagonistów MDM2 i Hub1. W pierwszej części opisano dwie grupy związków: trójpodstawione pochodne imidazolu i pochodne tryptofanu. Do najważniejszych osiągnięć opisanych w rozprawie należy odkrycie i scharakteryzowanie związków z pierwszej z wyżej wymienionych grup. Doktorantka otrzymała nowe pochodne imidazolu, przetestowała ich aktywność inhibitorową, przebadła je względem wybranych linii komórkowych a także określiła ich sposób wiązania za pomocą zaawansowanych technik NMR i krystalografii. Należy podkreślić bardzo wysoką aktywność inhibitorową niektórych związków z tej grupy (związek KH1, $K_i = 6$ nM). Jednakże, w tej części brakuje wyjaśnienia faktu zwiększenia aktywności inhibitorowej wynikającej z wprowadzenia atomu fluoru do cząsteczki WK23 prowadzące do związku KH1. Związki te wykazują ponad dwa rzędy różnicy aktywności, co powinno wynikać ze specyficznych oddziaływań z badanym białkiem. W tym kontekście przedstawiono bardzo ciekawe wyniki zmian przesunięcia chemicznego reszt białka MDM2 po związaniu KH1. Niestety w wykresie tym brakuje informacji, których jąder dotyczą poszczególne słupki. Co więcej, aby w pełni zinterpretować te dane potrzebny byłby analogiczny eksperyment dla związku WK23. Czy na

podstawie struktur krystalicznych i wyników NMR można zaproponować specyficzne oddziaływania atomu fluoru w związku KH1 z MDM2? Warto zauważyć, że podobny efekt był opisany ostatnio w literaturze (J. Med. Chem., 2015, 58, 7465).

Kolejnym bardzo interesującym wynikiem badań doktorantki było wskazanie dimeryzacji białka MDM2 w wyniku wiązania związku KH25. Potwierdzenie tego zjawiska w roztworze oparto na eksperymentach NMR i chromatografii. Porównano widma NMR wolnego białka i w kompleksie z KH25 oraz RG7388. Jednakże brakuje szczegółowej dyskusji tych wyników. Konkluzja o poszerzeniu pików powinna być poparta informacją, które sygnały były porównane i jakie są ich szerokości połówkowe.

Druga część pracy związana jest z poszukiwaniem antagonistów białka Hub1. W tym przypadku zadanie było znacznie trudniejsze, ponieważ nie są znane żadne małowcząsteczkowe inhibitory oddziaływania Hub1/Snu66. Doktorantka opracowała ekspresję i oczyszczanie białka Hub1 a następnie przeprowadziła testy przesiewowe dla ponad 2 000 związków metodą SOFAST HMQC. W wyniku wielkiego nakładu pracy eksperymentalnej odkryto kilka związków oddziałujących z Hub1. W tej części pracy warto byłoby wskazać, że fragment D2 z płytki 1, to po prostu kwas malonowy. Konieczne jest także uściślenie, czy badano jednocześnie mieszaninę 3 związków (jak podano w tekście), czy 5 związków (jak opisano na rysunku 41). Większość znalezionych związków ma charakter kwasowy – czy możliwe jest wskazanie w strukturze krystalicznej białka Hub1 potencjalnego miejsca wiązania tego typu związków? Czy mogłyby one hamować oddziaływanie z białkiem Snu66?

Ostatni rozdział pracy — materiały i metody zawiera informacje eksperymentalne dotyczące ekspresji i izolacji białek, syntezy związków i pomiarów NMR. Synteza i charakterystyka nowych związków jest opisana bardzo skrupulatnie, jednakże pomiary NMR zostały opisane zbyt ogólnie (nie są podane rozdzielczości widm, liczby skanów, stężenia białka/inhibitora dla różnych typów eksperymentów).

Chciałbym podkreślić, że powyższe uwagi krytyczne nie umniejszają mojej bardzo wysokiej oceny przedstawionej pracy, a mają na celu wywołanie dyskusji naukowej.

Podsumowując, stwierdzam, że Doktorantka przedstawiła bardzo ciekawy materiał, który wymagał znaczącego nakładu pracy eksperymentalnej, a wyniki są znaczącym wkładem w kierunku znalezienia skutecznych inhibitorów wybranych oddziaływań białko-białko.

Stwierdzam także z całym przekonaniem, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Katarzyny Kubicy 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 Kubicy do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Julian Bet. d