



Wrocław, 7 czerwca 2016 r.

Ocena pracy doktorskiej mgr Katarzyny Kubicy zatytułowanej:

„Characterization of small-molecule antagonists for oncogenic proteins Mdm2 and Hub1”

Praca doktorska mgr Katarzyny Kubicy dotyczy syntezy i charakterystyki związków chemicznych będących antagonistami dwóch ważnych z medycznego punktu widzenia oddziaływań: Mdm2-p53 oraz Hub1-Snu66. Rozdysocjowanie pierwszego z oddziaływań uchodzi powszechnie za możliwość skutecznego sposobu leczenia nowotworów, a odblokowanie drugiego kompleksu może być metodą terapii chorób neurodegeneracyjnych, nowotworów czy przedwczesnego starzenia. Doktorat dotyczy aktualnej tematyki podejmowanej przez instytucje akademickie i koncerny farmaceutyczne na całym świecie.

Rozprawa doktorska mgr Kubicy napisana jest po angielsku w formie maszynopisu liczącego 102 strony. W rozdziale 2, będącym wprowadzeniem do doktoratu, mgr Kubica przedstawiła strukturę kompleksów p53-Mdm2 oraz Hub1-Snu66, a także metody stosowane w doktoracie: zasady reakcji wieloskładnikowych oraz zasady stosowania magnetycznego rezonansu jądrowego do poszukiwania leków będących antagonistami oddziaływań białko-białko. Rozdział 3 to główny rozdział rozprawy doktorskiej, przedstawiający wyniki uzyskane w doktoracie. Pozostałe rozdziały doktoratu to: napisane po polsku *Streszczenie*, krótki rozdział 4 *Conclusions and perspectives*, obszerny rozdział 5 *Materials and methods*, wykaz skrótów (rozdział 6) i zestawienie piśmiennictwa (rozdział 7). Ponadto na końcu rozprawy zamieszczone są dwa dodatki zestawiające sekwencje aminokwasowe białek oraz struktury związków chemicznych z bibliotek użytych do testowania oddziaływania z białkiem Hub1. W rozprawie brakuje krótkiego rozdziału o celu podjętych badań, który jest zwykle zamieszczany w polskich rozprawach doktorskich. Język angielski stosowany w pracy jest niezły, choć autorka nie ustrzegła się błędów ortograficznych, interpunkcyjnych czy tzw. literówek.

Jak wspomniałem, w rozdziale 3 doktorantka przedstawiła uzyskane wyniki. Najważniejsze dotyczą antagonistów oddziaływania Mdm2-p53. Autorka użyła w tym celu opisanego

w publikacji Popowicz et al. (2010) związku WK23, który oddziałuje z Mdm2 ze stałą dysocjacji $0,92 \mu\text{M}$. Związek ten jest oparty o strukturę imidazolu i zawiera podstawniki w pozycjach 1, 4 i 5, a jego struktura dobrze wpasowuje się do trzech kieszeni na powierzchni Mdm2. Doktorantka otrzymała 12 pochodnych związku WK23. Stałe dysocjacji zostały zmierzone w teście polaryzacji fluorescencji z zastosowaniem związku kompetycyjnego. Moje pytanie: czy doktorantka sama zmierzyła stałe dysocjacji podane w Tabeli 2? Pytam, gdyż nie znalazłem w rozprawie odpowiedniego opisu tych pomiarów w rozdziale *Materiały i metody*. Ze związków tych najniższą stałą dysocjacji (równą 6 nM) posiadał związek KH1, który został poddany dalszej optymalizacji poprzez reakcję estryfikacji, dostarczając związków KH24 i KH25, o około rząd gorszym powinowactwie do Mdm2.

Szereg otrzymanych związków, w tym KH1, KH24 i KH25 zostało przetestowanych *in vitro* na liniach komórkowych. Wprawdzie wyniki uzyskane na liniach U2OS i HTC 166 wymagały niemal dziesięciokrotnie wyższego stężenia związków KH1 i KH25 niż komercyjnie dostępnego związku RG7388, to można uznać je za zachęcające do podjęcia dalszych badań. Oba związki charakteryzowały się około trzykrotnie niższą wartością IC_{50} dla linii U2OS w stosunku do kontrolnych komórek Saos2.

Analiza wiązania związku KH1 do Mdm2 przeprowadzona dla kilku związków (w tym KH1 i KH25) z zastosowaniem widm NMR typu HSQC potwierdziła silne ich wiązanie do białka w pobliżu miejsca oddziaływania z p53. Eksperymenty jednowymiarowego protonowego NMR pokazały ponadto, że oba związki były zdolne rozdysocjować kompleks p53-Mdm2.

Dalsze badania pozwoliły ustalić strukturę krystaliczną kompleksu Mdm2-KH25. Mam pytanie o udział doktorantki w tych badaniach, bo znowu nie znalazłem stosownej informacji w rozdziale *Materiały i metody*. Widoczna w strukturze krystalicznej dimeryzacja Mdm2 została potwierdzona przez doktorantkę metodą filtracji żelowej oraz protonowych widm NMR, charakteryzujących się poszerzeniem linii pochodzących od białka tylko w obecności KH25.

Oddzielna i o wstępnym charakterze część badań doktorantki dotyczyła związków oddziałujących z Hub1. Posługując się danymi strukturalnymi kompleksu Hub1 z domeną HIND białka Snu66 mgr Kubica przeprowadziła poszukiwania odpowiednich związków komplementarnych do powierzchni Hub1. Zastosowanie reakcji wieloskładnikowych pozwoliło na syntezę kilku odpowiednich związków, ale żaden z nich nie oddziałował

z Hub1, co doktorantka pokazała w eksperymencie HSQC. Dlatego doktorantka wykorzystwała w następnym etapie dwie dostępne biblioteki złożone z 500 i 1500 związków. Dla niektórych ze związków doktorantka zaobserwowała słabe oddziaływanie z Hub1 w eksperymencie SOFAST HSQC.

Podsumowując wyniki uzyskane w doktoracie, stwierdzam że mgr Kubica w pracy doktorskiej zastosowała szereg zaawansowanych metod, w tym znakowanie izotopowe białek, wieloskładnikową syntezę chemiczną, rejestrację kilku różnych typów widm NMR i modelowanie molekularne, co dobrze rokuje dla jej dalszego rozwoju naukowego i świadczy o umiejętności projektowania i charakterystyki kandydatów na leki.

Poniżej podaję kilka przykładowych błędów, jakie można znaleźć w tekście doktoratu:

- str. 15, 9 linijka od góry, „...inhibitors that have molecular weight lower than 500 kDa...”,
- str. 20, opis rysunku: „...asparagine (D22) of Hub1..” ,

Ponadto: czy stężenie kompleksu Mdm2-p53 podane na str. 63 było rzeczywiście w zakresie 0,015 do 0,03 μM ?

Podsumowując, moja ocena przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej mgr Katarzyny Kubicy zatytułowanej: „Characterization of small-molecule antagonists for oncogenic proteins Mdm2 and Hub1” jest pozytywna, a rozprawa spełnia warunki ujęte stosownymi przepisami, ujętymi w art. 13 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z 2003 r. Wnoszę o dopuszczenie przez Wysoką Radę Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego mgr Kubicy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Jacek Otlewski