

Recenzja

pracy doktorskiej Pani mgr Beaty M. Łabuzek

pt. „Small-molecule inhibitors, stapled peptides, and homo-PROTACs against oncogenic proteins: Mdm2 and CD44, as a basis of anticancer therapy”

wykonanej pod kierunkiem Profesora Tadeusza Holaka w Zespole Biologii Chemicznej i Projektowania Leków na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego

Tematyka recenzowanej rozprawy doktorskiej jest ściśle związana z problematyką badań prowadzonych przez zespół promotora (m.in. w ramach programów NCN MAESTRO 3 i SYMFONIA 2), które najogólniej ujmując, koncentrują się wokół zagadnień związanych z poszukiwaniem nowych strategii terapii przeciwnowotworowych, na drodze modyfikacji oddziaływań pomiędzy białkami, odgrywającymi istotną rolę w procesach nowotworzenia. W przypadku badań podjętych przez Panią mgr Beatę Łabuzek tymi celami molekularnymi były dwa rodzaje białek. Pierwsze z nich to Mdm2 i MdmX hamujące aktywność niezbędnego dla utrzymania stabilności genetycznej białka p53, drugim jest glikoproteina CD44, która występuje na powierzchni większości komórek w tym również nowotworowych.

Białko p53 jest jednym z najważniejszych supresorów chroniących komórki przed wejściem na ścieżkę transformacji nowotworowej. Aktywowane przez czynniki stresowe, głównie uszkodzenia DNA, indukuje ekspresję genów odpowiedzialnych m. in. za zatrzymanie cyklu komórkowego, naprawę DNA oraz apoptozę. Upośledzenie aktywności p53 jest cechą wspólną niemal wszystkich ludzkich nowotworów, co jest związane również z nadekspresją jego negatywnych regulatorów, Mdm2 i MdmX. Udokumentowane w literaturze badania prowadzone nad przywróceniem funkcjonalności niezmutowanego p53, obejmują blokowanie aktywności tych negatywnych regulatorów przy użyciu różnych klas cząsteczek.

W też kierunku zostały podjęte badania Doktorantki, przedstawione w pierwszej części rozprawy. Obejmowały one identyfikację nowych związków wykazujących działanie inhibitorów interakcji p53-Mdm2/MdmX oraz innowacyjnych cząsteczek, które wykorzystując naturalną aktywność ligazy ubikwitynowej E3, mogą ukierunkować białko Mdm2 na drogę proteolitycznej degradacji zależnej od ubikwityny. Z kolei glikoproteina CD44, która stanowi ważny element macierzy zewnątrzkomórkowej jest receptorem dla kwasu hialuronianowego, ale może również oddziaływać z innymi ligandami i aktywować wiele ścieżek sygnałowych. CD44 pośredniczy w interakcjach międzykomórkowych, interakcjach komórek z macierzą, a także w regulacji wielu komórkowych procesów fizjologicznych. Co istotne, CD44 jest powszechnie ekspresjonowane również przez komórki nowotworowe, a dostępne analizy kliniczne wskazują na zaangażowanie tego białka w rozwój agresywnych form raka.

Biorąc pod uwagę jego aktywność w rozwoju i progresji nowotworów, druga część badań zrealizowanych w ramach pracy doktorskiej skupiała się na poszukiwaniu małowcząsteczkowych inhibitorów CD44, zdolnych do blokowania jego oddziaływania z kwasem hialuronowym.

Recenzowana rozprawa doktorska została napisana w języku angielskim i ma układ klasyczny. Główne rozdziały to kolejno: streszczenie w języku angielskim i polskim, przedstawienie celów badań, wprowadzenie będące częścią literaturową, opis otrzymanych wyników wraz z ich dyskusją, opis materiałów i metod oraz zestawienie wg kolejności alfabetycznej cytowanej literatury.

Założenia pracy w odniesieniu do białek Mdm2 i MdmX dotyczyły identyfikacji związków zdolnych do blokowania interakcji p53-Mdm2/MdmX na drodze klasycznej inhibicji lub tzw. degraderów homoProtac zdolnych do kierowania Mdm2 do samoeliminacji w proteasomie. Ponadto Doktorantka podjęła zadanie scharakteryzowania strukturalnych podstaw badanych oddziaływań. Drugim celem pracy doktorskiej było wyselekcjonowanie małowcząsteczkowych inhibitorów oddziaływania CD44 z kwasem hialuronowym oraz wyjaśnienie ich sposobu wiązania na podstawie struktur krystalicznych kompleksów białko-ligand.

Zgodnie z przyjętym zwyczajem wstępna część rozprawy przybliży zagadnienia związane z tematyką zrealizowanych badań. Odpowiedni rozdział pracy doktorskiej zawiera szczegółową charakterystykę białek p53, Mdm2 i MdmX, omówienie ich roli i wzajemnych interakcji oraz przegląd dotychczas opracowanych związków wpływających na aktywność Mdm2/MdmX. W nawiązaniu do drugiej części badań, przedstawiona zostały: struktura i funkcja białka CD44 z uwzględnieniem jego roli w rozwoju nowotworów, naturalne ligandy CD44 oraz opublikowane dotąd w literaturze naukowej inhibitory tego białka.

Nie mam uwag dotyczących wyboru tematyki części teoretycznej opracowanej przez mgr Beatę Łabuzek. Stanowi ona adekwatne wprowadzenie do wyników uzyskanych w ramach realizacji pracy doktorskiej zaprezentowanych w kolejnych dwóch rozdziałach.

Materiał przedstawiony w pierwszym z nich, obejmuje: badania peptydów typu „stapled” pod względem zdolności hamowania interakcji p53-Mdm2/MdmX i związków zaprojektowanych jako dwufunkcyjne cząsteczki jako tzw. degradery homo-PROTAC oraz charakterystykę aktywności i oddziaływań z białkiem Mdm2 związku oznaczonego numerem 20.

Opis prac eksperymentalnych rozpoczyna rozdział zatytułowany „Expression and purification of Mdm2 and MdmX proteins”, z którego dowiadujemy się, że wykorzystywany w badaniach materiał genetyczny otrzymano jako donację Instytutu Maxa Plancka, produkcję rekombinowanych białek Mdm2 i MdmX prowadzono w jednym z najpopularniejszych systemów ekspresyjnych, tj. Escherichia Coli, a do oczyszczania i analizy białek wykorzystano powszechnie stosowaną technikę elektroforetyczną SDS-PAGE. Nie podważając konieczności i skrupulatności raportowania wszystkich wyników uzyskanych w toku pracy, uważam, że bardziej odpowiednim miejscem do zamieszczenia tego rodzaju informacji byłby końcowy rozdział „Materials and protocols”.

W dalszej części przedstawiono krótki zarys badań zrealizowanych w zagranicznych jednostkach naukowych z Kuby, Holandii i Niemiec, które prowadziły do otrzymania 8 peptydów typu „stapled”, analizowanych następnie przez Doktorantkę za pomocą różnych metod, w celu oznaczenia poziomu ich aktywności i scharakteryzowania interakcji z docelowymi białkami. Zastosowane testy polaryzacji fluorescencji i techniki termoforezy mikroskalowej pozwoliły na ilościową ocenę powinowactwa badanych peptydów do Mdm2 i MdmX. Uzyskane wyniki wskazały, że wszystkie badane związki charakteryzuje wysokie (nanomolarne) powinowactwo do obu typów białek, przy czym najwyższą aktywność zidentyfikowano dla peptydów 7 i 8. Dalsze eksperymenty NMR, które przeprowadzono dla związku 8, zobrazowały jego miejsce wiązania na powierzchni Mdm2 i MdmX w obrębie kieszeni wiążącej białko p53. Dodatkowo analiza, opracowanych przez współpracowników Doktorantki, struktur krystalicznych kompleksów z białkiem Mdm2 i trzech peptydów (3, 7 i 8) potwierdziła, że ich tryb wiązania naśladuje sposób interakcji p53 z białkiem Mdm2.

Druga grupa charakteryzowanych przez mgr Beatę Łabuzek związków, to ligandy typu homo-PROTAC opracowane przez grupę naukowców z Uniwersytetu w Groningen, które mając zdolność indukowania homodimeryzacji ligaz ubikwitynowych E3, a w tym wypadku białka Mdm2, powodują ich samodegradację w proteasomie. Badania Doktorantki skupiały się na ocenie ich aktywności pod względem wiązania z białkiem Mdm2, w oparciu o metody biochemiczne *in vitro* i spektroskopowe NMR. Na podstawie przeprowadzonych pomiarów polaryzacji fluorescencji, wskazano 7 pochodnych charakteryzujących się stałą inhibicji K_i w zakresie od 35 do 254 nM. Kolejno dla 6 z nich, o zadowalającej rozpuszczalności, zarejestrowano widma 2D NMR (1H-15N- HSQC) potwierdzające wiązanie pięciu badanych związków do białka Mdm2. W celu określenia czy dimeryzacja cząsteczek Mdm2 jest rzeczywiście indukowana przez badane związki, wykonano pomiary 1D¹H NMR, jednak uznano, że otrzymane wyniki nie pozwalały na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków. Rezultaty dodatkowych analiz chromatograficznych SEC pozwoliły jednak zidentyfikować prawdopodobieństwo dimeryzacji białka Mdm2 w roztworze pod wpływem jednego ze związków.

Trzecie zadanie, podjęte przez mgr Beatę Łabuzek w ramach badań ukierunkowanych na oddziaływanie p53-Mdm2, było skoncentrowane na charakterystyce biochemicznej i strukturalnej małej cząsteczkowego związku o numerze 20. Testowany związek, został zsyntezowany przez niemiecką grupę z Instytutu Chemii Organicznej Uniwersytetu w Lipsku, jako bliski analog znanego, specyficznego dla białka Mdm2, inhibitora Nutlin-3a. W przeprowadzonych przez Doktorantkę testach biochemicznych *in vitro* wykazywał znacznie większą niż prekursor, zdolność inhibicji Mdm2, a jego ścisłą interakcję z białkiem potwierdzono w eksperymentach NMR.

Co ciekawe, w przeprowadzonych kolejno badaniach krystalograficznych, rozwiązana struktura kompleksu uwidoczniała, że w tworzenie miejsca wiążącego dla związku 20 zaangażowane są dwie cząsteczki białka Mdm2. Możliwość dimeryzacji Mdm2 w roztworze wykluczyły jednak wyniki eksperymentów NMR i chromatografii SEC.

Rezultaty wszystkich testów przeprowadzonych w celu identyfikacji związków wpływających na interakcje białek p53-Mdm2/MdmX zostały podsumowane w odrębnym

rozdziale, w którym wskazano również kierunki dalszych prac nad weryfikacją ich potencjału terapeutycznego.

Druga część rozprawy doktorskiej poświęcona omówieniu wyników badań własnych obejmuje charakterystykę związków wiążących się z receptorem CD44. Tutaj analogicznie jak poprzednio, początkowy rozdział zatytułowany „Constructs, expression and purification of the CD 44 protein” moim zdaniem powinien być umieszczony w rozdziale 6. „Materials and protocols”.

Kolejno przedstawione zostały wyniki skriningu prowadzonego metodami spektroskopowymi, wspólnie z dr. Popowiczem z Instytutu Biologii Strukturalnej z Centrum Helmholtza w Monachium. Z biblioteki 1400 fragmentów wyselekcjonowano cztery o milimolowym powinowactwie do białka CD44, a analiza widm NMR jednego ze związków ujawniła odrębne od pozostałych miejsce wiążące, w którym CD44 prawdopodobnie oddziałuje również z oktamerem kwasu hialuronowego. W toku następnych badań przesiewowych wyodrębniono kolejne 4 małowcząsteczkowe związki charakteryzujące się dwoma różnymi sposobami wiązania z CD44.

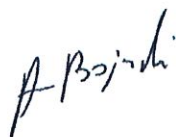
Drugą metodą, którą zastosowano do poszukiwania nowych aktywnych związków w obrębie posiadanej biblioteki fragmentów, był test przesunięcia temperatury topienia białka – TSA (Thermal Shift Assay). Na podstawie otrzymanych wyników zidentyfikowano 9 nowych cząsteczek, jednakże ich aktywność nie została potwierdzona w rejestrowanych widmach 1D ^1H NMR.

Ostatnia część pracy opisuje eksperymenty przeprowadzone w celu krystalizacji białka CD44 i kokrystalizacji wyselekcjonowanych w przesiewowych testach fragmentów w kompleksie z białkiem CD44. Pomimo wielu prób optymalizacji warunków krystalizacji uzyskane kryształy CD44 były nieodpowiedniej jakości do dalszych badań, jak również podjęte próby kokrystalizacji z wybranymi związkami zakończyły się niepowodzeniem. Nie udało się także otrzymać kryształów kompleksu ludzkiego białka CD44 z oktamerem kwasu hialuronowego, którego struktura powinna dostarczyć cennych informacji o charakterze wzajemnych interakcji. W tym miejscu pragnę podkreślić, że w mojej opinii zamieszczenie w pracy doktorskiej wyników badań, które nie przyniosły spodziewanych rezultatów, niczym nie umniejsza wartości naukowej całego materiału przedłożonego do recenzji. Wręcz przeciwnie wskazują one na determinację Doktorantki w dążeniu do wyjaśnienia zaobserwowanych zjawisk, a niekwestionowanym benefitem podjętych przez Nią prób jest niewątpliwie poszerzenie i tak już bogatego warsztatu metodologicznego o techniki krystalizacji białek.

Warto także nadmienić, że wyniki pozostałych eksperymentów przedstawione przez mgr Beatę Łabuzek w rozprawie doktorskiej zostały zamieszczone w trzech publikacjach naukowych, których Doktorantka jest współautorką i opublikowane w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym.

Podsumowując, moja ocena przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej mgr Beaty Łabuzek, zatytułowanej: „Small-molecule inhibitors, stapled peptides, and homo-PROTACs

against oncogenic proteins: Mdm2 and CD44, as a basis of anticancer therapy” jest pozytywna, a rozprawa spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz.1789) oraz art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r. poz. 1669). W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie przez Radę Dyscypliny Nauk Chemicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego Panią mgr Beatę Łabuzek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Andrzej Bojarski

