



Wroclaw, 23.08.2016

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 Magiera, pt.: "Interaction of small-molecule inhibitors with the deubiquitinating protease USP2"

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Katarzyny Magiery została wykonana pod opieką prof. dr Tadeusza Holaka i dotyczy poszukiwania małowcząsteczkowych inhibitorów deubikwitynazy USP2. Możliwość zahamowania nadmiernej aktywności białek deubikwitynujących stanowi podstawę do opracowania nowoczesnych leków celowanych mających zastosowanie między innymi w terapii chorób nowotworowych.

Mechanizm usuwania nieprawidłowych białek z komórki poprzez ich degradację w proteasomie jest regulowany przez proteazy specyficzne dla ubikwityny. Proteazy te wykazują zdolność do odcinania cząsteczki ubikwityny od białek i poprzez to hamują ich rozkład hydrolityczny przez proteasom. Udowodniono, że nadekspresja proteaz z rodziny USP, w tym białka USP2, jest powiązana z rozwojem wielu typów chorób nowotworowych. W ostatnich latach udowodniono także udział deubikwitynazy USP2 w stabilizacji białek o znanych właściwościach onkogennych: białka Mdm2, cykliny D1 oraz syntazy kwasów tłuszczowych. Białko USP2 jest, zatem dobrym celem molekularnym dla opracowania antynowotworowej terapii celowanej jednak do tej pory nie zostały opisane inhibitory tej deubikwitynazy o pożądanych właściwościach.

Rozprawa doktorska mgr inż. Katarzyny Magiery została przygotowana w języku angielskim i liczy 110 stron. Układ pracy jest klasyczny i zawiera streszczenie (w języku angielskim i polskim), cel pracy, wstęp literaturowy, wyniki i dyskusję, stosowane materiały i metody, spis skrótów oraz spis cytowanej literatury.

Praca jest napisana starannym językiem z zachowaniem poziomu szczegółowości niezbędnym w rozprawach naukowych. Kilka niedociągnięć edytorskich (np.: nieczytelne podpisy osi w rysunkach 2.2, 2.4, 2.5, 2.6, brak opisu markerów masy na elektroforegramach, użycie litery 'u' w zamian greckiego 'μ', brak podpisów rysunku na tej samej stronie – rysunki 2.1, 2.18, 2.21) nie utrudnia czytania rozprawy. Bardziej znaczącym błędem jest brak informacji, że rysunek 1.7 pochodzi z publikacji Rénatus et al. 2006 (która jednakże jest zacytowania w tekście).

We wstępie Doktorantka opisuje rolę enzymów deubikwitynujących w degradacji białek przy udziale systemu ubikwityna–proteasom. W szczególności, przedstawiona jest funkcja białka USP2 i jego właściwości onkogennych. Krótko zaprezentowana jest także znana struktura kompleksu USP2-ubikwityna. W tym miejscu brakuje jednakże szczegółowego opisu miejsca aktywnego wraz z rysunkiem obrazującym odpowiedni fragment struktury krystalicznej (kompleksu enzymu z ubikwityną).

We wstępie Autorka dodatkowo opisuje podstawy metody '*fragment-based screening*' a także krótko omawia obecny stan wiedzy na temat właściwości antynowotworowych endogennych kwasów o rdzeniu steroidowym – pochodnych kwasu litocholowego.

Część pracy dotycząca wyników badań rozpoczyna się opisem ekspresji i oczyszczania stosowanych białek. Podrozdział dotyczący otrzymywania białka USP2a pokazuje znaczący nakład pracy Doktorantki w celu opracowania skutecznej metodologii oczyszczania preparatu białkowego. Jednakże opisywanie ekspresji i oczyszczania ubikwityny w części 'Wyniki' jest niepotrzebne, ponieważ ten fragment pracy nie stanowi nowości naukowej (jest to powtórzenie znanej od wielu lat procedury).

Do najważniejszych spośród uzyskanych wyników należy odkrycie przez autorkę do tej pory nieznaną zdolności do hamowania aktywności USP2 przez pochodne kwasu litocholowego. Doktorantka przebadła grupę pochodnych tego kwasu wyłaniając dwie o wysokim powinowactwie do białka USP2 (IC_{50} 5.8 i 9.7 μ M). Co ważne, bezpośrednie oddziaływanie badanych związków z białkiem było potwierdzone metodą '*thermal shift*'. Bardzo ciekawe wyniki otrzymano w wyniku analizy kinetyki reakcji hydrolizy w obecności

pochodnych kwasu litocholowego. Dlaczego jednak nie wyznaczono stałych inhibicji (K_i)? Wartości K_i są znacząco lepszymi ocenami aktywności inhibitorowej niż IC_{50} . Następnie na trzech pochodnych z tej grupy przeprowadzono testy na liniach komórkowych nowotwory jelita grubego. Wzrost komórek nowotworowych był wyraźnie zahamowany i wiązał się z obniżeniem poziomu cykliny D1, co pokazuje duży potencjał terapeutyczny badanych związków.

W kolejnym podrozdziale opisano wyniki testów przesiewowych 1500 związków względem USP2a za pomocą STD-NMR. Odkryto nową strukturę wiodącą — 5-(2-tienylo)-3-izoksazol (związek STD1), którą następnie udało się zoptymalizować otrzymując związek STD1T. Inhibitor ten wykazywał $IC_{50} = 3.3 \mu\text{M}$, co daje aktywność ok. 400 razy wyższą niż związek wyjściowy (nie jak pisze Doktorantka 1000 razy). W tym przypadku także brakuje dalszych badań kinetycznych, które pozwoliłyby określić K_i i typ inhibicji. Na podkreślenie zasługuje potwierdzenie działania związku STD1T na nowotworowych liniach komórkowych.

Duże znaczenie w poszukiwaniu niskocząsteczkowych inhibitorów białka USP2 mogą mieć również opisane wstępne badania biblioteki fragmentów przy użyciu testu fluorescencyjnego. Znalaziono kilkanaście związków o aktywności w zakresie mikromolarnym (najlepszy związek charakteryzuje się $IC_{50} = 16.2 \mu\text{M}$). Niestety tabelę prezentującą te wyniki błędnie podpisano jako dane dotyczące pochodnych związku STD1. W przypadku tej grupy związków nie przeprowadzono żadnych dodatkowych testów potwierdzających specyficzne wiązanie do białka, czy badań na liniach komórkowych.

W ostatnim podrozdziale części 'Wyniki' opisano próby otrzymania struktury krystalicznej apo-enzymu. Należy docenić znaczący wysiłek Doktorantki włożony w ten fragment badań. Pomimo wielu prób krystalizacji, otrzymania szeregu mutantów a także prób krystalizacji z fragmentami ubikwityny, nie udało się osiągnąć założonego celu. Czy były prowadzone próby krystalizacji z otrzymanymi niskocząsteczkowymi inhibitorami?

W czasie obrony proszę także Doktorantkę o odniesienie się do następujących problemów:

1. Czy na podstawie znanej struktury krystalicznej kompleksu ubikwityna-USP2a można zaprojektować niskocząsteczkowe nieodwracalne inhibitory USP2a?
2. Czy można skorelować wyniki pomiarów STD-NMR (np. strukturę związku STD1) z wynikami badań w zakresie '*fragment-based screening*'? Czy na tej podstawie można się zaproponować nowe struktury inhibitorów?

Podsumowując, stwierdzam z pełnym przekonaniem, że recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Katarzyny Magiery 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 inż. Katarzyny Magiery do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę nowatorskość i szeroki zakres prowadzonych badań, a także duże znaczenie otrzymanych wyników, stawiam wiosek o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani Katarzyny Magiery.

J. Białki