



Wrocław, 8 sierpnia 2016 r.

Ocena pracy doktorskiej mgr Katarzyny Magiery zatytułowanej:

„Interaction of small-molecule inhibitors with the deubiquitinating protease USP2”

Poszukiwanie specyficznych inhibitorów kompleksów białko-białko jest szybko rozwijającym się obszarem badań nad nowymi lekami przeciwnowotworowymi. Jednym z najważniejszych celów prac w tym zakresie są oddziaływania obejmujące kompleks ubikwityna-proteasom i oddziaływania, bądź reakcje enzymatyczne, z nim związane. Proteazy deubikwitynujące posiadają zdolność "ratowania" białek zaznaczonych do degradacji w proteasomie. Nadekspresja tych proteaz została zaobserwowana w komórkach szeregu nowotworów i są one obecnie uznane za obiecujący cel molekularny do opracowania nowych terapii przeciwnowotworowych.

Praca doktorska mgr Katarzyny Magiery dotyczy deubikwitynującej proteazy cysteinowej USP2 i poszukiwania związków chemicznych, które zdolne byłyby zahamować aktywność proteolityczną tego enzymu. Doktorantka w szczególności badała dwie grupy związków: pierwszą opartą o strukturę kwasu litcholowego i drugą wykorzystujące pochodne 5-(2-tienylo)-3-izoksazolu. Praca dotyczy ważnego i aktualnego zagadnienia poszukiwania antagonistów oddziaływania białko-białko celem zastosowania ich w charakterze środków terapeutycznych.

Praca doktorska mgr Magiery to napisany po angielsku maszynopis liczący 110 stron, o strukturze typowej dla prac doktorskich i publikacji z obszaru nauk eksperymentalnych (*Introduction, Results, Materials and methods*). Należy zauważyć, iż zamiast pełniejszej dyskusji praca zawiera, liczący tylko półtorej strony, rozdział *Conclusions and perspectives*.

Rozdział 2 rozprawy doktorskiej zawiera wyniki uzyskane w trakcie realizacji pracy doktorskiej. Do najważniejszych z nich zaliczam:

1. Produkcję oczyszczonej izoformy proteazy USP2a. W tym celu doktorantka opracowała własny protokół, który został później zastosowany do produkcji białka znakowanego izotopem ^{15}N , a także do jego wariantów mutacyjnych.
2. Zoptymalizowanie testu pomiaru aktywności proteazy USP2a, opartego o pomiary szybkości hydrolizy ubikwityny znakowanej pochodną kumaryny. Test użyty został następnie do pomiarów hamowania proteazy USP2a przez badane w pracy inhibitory.
3. Odkrycie inhibitorów białka USP2a będących pochodnymi kwasu litocholowego lub 5-(2-tienylo)-3-izoksazolu. Związki te oraz ich zoptymalizowane pochodne hamowały białko USP2a nawet w zakresie stężeń mikromolowych. Obie grupy związków nie były wcześniej badane, jeżeli chodzi o zdolność hamowania USP2a. Są to, moim zdaniem, najciekawsze wyniki tego doktoratu.
4. Ustanie że wspomniane powyżej związki hamowały wzrost komórek linii nowotworowej jelita grubego HCT116 oraz prowadziły do obniżenia poziomu cykliny D1. Wyniki były szczególnie obiecujące w przypadku pochodnych kwasu litocholowego.

Odmienna seria doświadczeń dotyczyła prób krystalizacji enzymu USP2a w formie z wolną kieszenią wiążącą. W tym celu doktorantka otrzymała grupę mutantów powierzchniowych białka (pojedynczych oraz wielokrotnych) oraz białko USP2a ze skróconą wersją ubikwityny. Tylko dla tego ostatniego konstruktów udało się uzyskać kryształy, które jednak nie dawały obrazu dyfrakcyjnego dobrej jakości. Mimo braku pozytywnych wyników prób krystalizacyjnych, podjęte próby należy odnotować za ważne i przeprowadzone sporym nakładem pracy.

Wyniki uzyskane w doktoracie mgr Magiery są wartościowe i mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań nad poszukiwaniem związków o potencjale terapeutycznym. Szczególnie obiecujące są pochodne kwasu litocholowego; wymagają one jednak obniżenia stałej inhibicji o około dwa-trzy rzędy wielkości. Mgr Magiera zastosowała w trakcie realizacji pracy doktorskiej szereg zaawansowanych metod, w tym metody klonowania DNA, znakowanie izotopowe białek w systemie bakteryjnym, oczyszczanie białek, rejestrację różnych widm NMR, pomiary fluorescencyjne aktywności enzymatycznej, próby krystalizacyjne oraz testy komórkowe *in vitro*. Opanowanie szeregu technik badawczych jest niezbędne na tym etapie rozwoju młodego badacza.

Doktorantka nie ustrzegła się jednak błędów w czasie redakcji doktoratu. Podaję kilka typowych:

- str. 17, 10 linijka od góry: K_i podane bezwymiarowo;
- szereg rysunków posiada nieczytelną skalę osi, dodatkowo bez opisu osi (np. Figure 2.2, 2.4, 2.5, 2.6A);
- opisy zdjęć żeli są niestaranne, poszczególne ścieżki oraz masy cząsteczkowe markerów masy są niewłaściwie oznaczone (np. Figure 2.3, 2.5B);
- opisy tytułów niektórych tabel i rysunków są nad wyraz skrótowe i mało informatywne (np. Table 2.1, 2.7, 2.8).

Ponadto, omawiając stałe kinetyczne zawarte w Table 2.5, doktorantka zauważa, że są one „*slightly different*”, w zależności od zastosowanego równania (Michaelisa-Menten lub Lineweavera-Burka. Jest to stwierdzenie niefrasobliwe, gdyż różnice w wartościach K_m sięgają 300%!

Podsumowując, moja ocena przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej mgr Katarzyny Magiery zatytułowanej: „*Interaction of small-molecule inhibitors with the deubiquitinating protease USP2*” 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 Magiery do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Jacek Otlewski