

**WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII**

ZAKŁAD INŻYNIERII BIAŁKA

ul. Joliot-Curie 14a  
50-383 Wrocław | Poland

tel. +48 71 375 28 89

[www.biotech.uni.wroc.pl](http://www.biotech.uni.wroc.pl)

Prof. Jacek Otlewski

Wrocław, 27 kwietnia 2017 r.

Ocena pracy doktorskiej mgr. Marcina Tomali zatytułowanej „Design and synthesis of inhibitors of the MDMX/p53 and USP2a/Ub interactions”

Poszukiwanie antagonistów oddziaływania białko-białko jest szybko rozwijającym się obszarem badań biomedycznych, w szczególności dotyczących opracowania nowych leków przeciwnowotworowych. Przedmiotem pracy doktorskiej mgr. Tomali są dwa kompleksy MdmX-p53 oraz USP2a-ubikwityna, oba o kluczowym znaczeniu dla funkcjonowania komórki rakowej.

Proteaza cysteinowa USP2a jest enzymem deubikwitynującym, zdolnym do "ratowania" białek, w tym białek Mdm2 i MdmX, przeznaczonych do degradacji w proteasomie. Nadekspresja proteaz deubikwitynujących została zaobserwowana w komórkach szeregu nowotworów i są one obecnie uznane za obiecujący cel molekularny do opracowania nowych terapii przeciwnowotworowych. Z kolei obniżona aktywność czynnika transkrypcyjnego p53 jest skorelowana z występowaniem licznych nowotworów u ludzi. Białkiem kontrolującym poziom p53 w komórce jest białko MdmX. Oddziaływanie MdmX z p53 prowadzi do obniżenia stężenia p53, a rozdzysocjowanie kompleksu obu białek jest powszechnie uważane za jedną z najbardziej obiecujących metod terapii przeciwnowotworowej.

Praca doktorska została wykonana w zespole prof. Holaka, który jest specjalistą w podjętej przez doktoranta tematyce i prowadził już liczne badania w obszarze związanym z poszukiwaniem antagonistów obu wspomnianych oddziaływań. W tym sensie praca doktorska stanowi kontynuację wcześniejszych poszukiwań.

Praca doktorska mgr. Tomali to napisany po angielsku manuskrypt liczący 110 stron. Strony 58 do 105 zawierają opis zastosowanych syntez związków chemicznych. Główne części doktoratu to *Introduction*, *Results* (zawierająca krótki rozdział *Conclusions*) oraz *Literature*. Ponadto rozprawa

zawiera listę skrótów, streszczenie w języku polskim (z kilkoma błędami ortograficznymi!) i angielskim. Język angielski stosowany w pracy jest akceptowalny, uderza jednak znaczna liczba tzw. literówek.

Wstęp do pracy jest bardzo krótki, bo liczy wraz z ilustracjami tylko cztery i pół strony. Jest więc oczywiste, że przedstawia tylko wybrane, najbardziej istotne informacje o przedmiocie badań i zostawia spory niedosyt, gdyż literatura przedmiotu jest ogromna i zasługuje na pełniejsze przedstawienie.

Pierwsza część przedstawionych badań dotyczyła antagonistów oddziaływania MdmX z p53. Posługując się danymi literaturowymi wskazującymi, że kwas litocholowy (LCA) jest antagonistą oddziaływania Mdm2/X z białkiem p53, doktorant zaprojektował koniugat tego kwasu tłuszczowego z analogami związku WW298, wcześniej badanego w grupie prof. Holaka, jako wiążącego się do MdmX. Doktorant uzyskał negatywny wynik – koniugaty nie wykazały spodziewanej aktywności biologicznej wobec białka MDMX, nie wiązały się też do MdmX, co pokazano w heteronuklearnym widmach  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC.

Przy okazji badań prowadzonych na liniach komórkowych z zastosowaniem małej biblioteki pochodnych LCA doktorant odkrył, że hydroksyamid kwasu litocholowego (LCAHA) ma wpływ na obniżenie poziomu cykliny D1. Mogło to być związane z potencjalnym jego wpływem na białko USP2a. Wyniki uzyskane przez doktoranta zostały opublikowane w czasopiśmie *Cell Chemical Biology*.

Dalsza część doktoratu dotyczyła poszukiwaniu syntetycznych antagonistów oddziaływania USP2a z ubikwityną. Doktorant wspomagał się wynikami dokowania molekularnego oraz spektroskopią heteronuklearnego NMR,  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC. Badania przesiewowe prowadzone na bibliotece 1500 fragmentów związków chemicznych wskazywały na oddziaływanie w przypadku 11 związków. Doktorant zmierzył aktywność pochodnych związku STD1, najsilniej oddziałującego z USP2a, wobec tej proteazy w teście enzymatycznym, otrzymując dla związku STDT stosunkowo wysokie powinowactwo ( $\text{IC}_{50} = 3,3 \mu\text{M}$ ). Związek STDT wykazywał ograniczoną rozpuszczalność w roztworach wodnych, co uniemożliwiło otrzymanie kryształów kompleksu z USP2a. Próby

poprawienia rozpuszczalności związku, poprzez modyfikację jego struktury, powodowały obniżenie powinowactwa do proteazy.

Moje uwagi do doktoratu:

- Figure 1. Czy rysunek został sporządzony przez doktoranta?
- tekst zawiera bardzo liczne błędy literowe, interpunkcyjne i czasem brzmi niezrozumiale (np. protolihitic activity, zamiast proteolytic activity, str. 26),
- tekst jest czasami trudny do zrozumienia. Na przykład na początku rozdziału 2.10 znajduje się informacja o 1500 badanych fragmentach, które nie wiadomo skąd pochodzą i dlaczego zostały użyte. Brakuje kilku zdań wprowadzenia w ten rozdział,
- rozdział przedstawiający zastosowane materiały i metody jest bardzo niepełny.

Podsumowując, stwierdzam, iż recenzowana rozprawa doktorska mgr. Marcina Tomali spełnia wymagania ujęte stosownymi przepisami. Wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr. Marcina Tomali do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

