



Wrocław, 3 sierpnia 2015 r.

Ocena pracy doktorskiej mgr Ewy Wrony zatytułowanej:

„Small-molecule inhibitors of the Mdm2-p53 protein-protein interaction”

Czynnik transkrypcyjny p53 jest kluczowym regulatorem transformacji nowotworowej zaangażowanym w szereg procesów komórkowych, w tym w aktywację apoptozy i uruchomienie mechanizmów naprawy DNA. Obniżona aktywność tego białka w komórce prowadzi do niestabilności genomu i jest silnie skorelowana z występowaniem nowotworów u ludzi. Najważniejszym czynnikiem kontrolującym poziom p53 w komórce jest białko Mdm2. Oddziaływanie Mdm2 z p53 prowadzi do obniżenia stężenia p53 a rozdzysocjowanie kompleksu obu białek jest powszechnie uważane za jedną z najbardziej obiecujących metod terapii przeciwnowotworowej. Tematyka doktoratu mgr Wrony dotyczy poszukiwania efektywnych antagonistów tego właśnie oddziaływania. Zadanie, jakiego podjęła się w doktoracie jest więc aktualne, ważne i wpisuje się w główny nurt badań nad poszukiwaniem nowych leków przeciwnowotworowych, jakie podejmowane są przez największe firmy farmaceutyczne. Praca została wykonana pod opieką prof. Holaka, który jest specjalistą w podjętej przez doktorantkę tematyce badawczej i autorem blisko 30 świetnych publikacji o tematyce związanej z tymi białkami.

Rozprawa doktorska mgr Wrony to napisany po angielsku maszynopis liczący 208 stron i podzielony na 6 rozdziałów. W rozdziale 1, służącym jako wprowadzenie do doktoratu, autorka opisała białka p53 i Mdm2, szczegóły ich wzajemnego oddziaływania oraz głównych niskocząsteczkowych antagonistów zdolnych do dysocjacji kompleksu p53-Mdm2. Rozdziały 2 i 3 to trzon doktoratu, w których doktorantka przedstawiła zasadnicze wyniki: rozdział 2 dotyczy pochodnych 1,5-dihydro-2*H*-pirol-2-onu a rozdział 3 opisuje badania pochodnych tetrazolu. Rozdział 4 omawia szczegóły syntezy chemicznej a rozdział 5 techniki spektroskopowe i krystalograficzne stosowane w pracy; jednak wbrew tytułowi tego rozdziału nie ma w nim zawartych informacji na temat produkcji białek. W rozprawie brakuje również rozdziału o celu podjętych badań.

Mam znaczne zastrzeżenia odnośnie redakcji doktoratu. Liczba błędów ortograficznych, interpunkcyjnych i tzw. literówek jest ogromna. Streszczenie napisane w języku polskim zawiera dziesiątki błędów na dwóch stronach tekstu! Język angielski jest również bardzo słaby, do najczęstszych błędów należy błędne stosowanie liczby pojedynczej i mnogiej oraz następstwa czasów. Przy oprogramowaniu do edycji tekstów stosowanym obecnie, uwzględniającym korektę językową, liczba błędów edytorskich powinna być minimalna.

Jak wspominałem, w rozdziałach 2 i 3 mgr Wrona przedstawiła obszernie i wnikliwie omówiła uzyskane wyniki. Do najciekawszych spośród nich zaliczam:

1. Syntezę 14 związków chemicznych będących pochodnymi 1,5-dihydro-2*H*-pirol-2-onu oraz zbadanie ich aktywności z zastosowaniem widm ^1H NMR. Związki zaprojektowano tak, aby naśladowały strukturę tworzoną przez reszty aminokwasowe Phe19, Leu26 oraz Trp23 białka p53, które są w zasadniczym stopniu odpowiedzialne za oddziaływanie z Mdm2, i w ten sposób konkurowały z p53 o wiązanie do Mdm2. Struktura związków została potwierdzona metodą krystalografii i dwuwymiarowych widm NMR. Miareczkowanie białka Mdm2 otrzymanymi związkami, z zastosowaniem widm ^1H - ^{15}N HSQC, pozwoliło określić stałe dysocjacji, które znajdowały się zwykle w zakresie submilimolowym. Dwa związki, określone jako 1a i 2a, wykazujące najmocniejsze oddziaływanie z Mdm2 (stałe dysocjacji poniżej 1 μM), wiążą się do Mdm2 w sposób niekanoniczny, zostawiając kieszeń wiążącą Trp23 pustą i indukując dimeryzację Mdm2, co doktorantka pokazała rozwiązując struktury krystaliczne odpowiednich kompleksów. Jest to, moim zdaniem, jedno z najważniejszych osiągnięć doktoratu.
2. Syntezę 24 pochodnych tetrazolu opartą o zastosowanie wieloskładnikowej reakcji Ugi oraz określenie ich aktywności. W tym podejściu doktorantka wykorzystowała oprogramowanie AnchorQuery do zaprojektowania antagonistów opartych o odmienny, czteropunktowy, sposób wiązania do Mdm2. Do określenia stałych dysocjacji mgr Wrona zastosowała technikę polaryzacji fluorescencji, a strukturę przykładowego antagonisty potwierdziła metodę rentgenografii. Wszystkie otrzymane pochodne tetrazolu okazały się być antagonistami oddziaływania p53 z Mdm2 ze stałymi dysocjacji dochodzącymi do 20 nM, a więc mocniejszymi niż związki oparte o pochodne 1,5-dihydro-2*H*-pirol-2-onu. Podobnie jak w przypadku poprzedniej grupy związków, autorka przeprowadziła wartościową analizę zależności struktura-funkcja

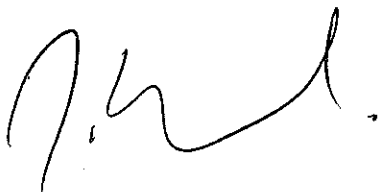
na podstawie analizy struktury chemicznej otrzymanych ligandów i ich stałych dysocjacji.

Opisane powyżej najważniejsze wyniki doktoratu uważam za oryginalne i wartościowe. Niektóre z opisanych związków mogą być w przyszłości optymalizowane w celu znalezienia jeszcze mocniejszych antagonistów oddziaływania p53-Mdm2. Oprócz tych, jakże skrótowo przedstawionych przeze mnie, głównych wyników doktoratu w pracy znajduje się znaczna ilość wnikliwych opisów syntez chemicznych i analiz strukturalnych, które powodują, że doktorat czyta się jak dojrzałe opracowanie naukowe. Mgr Wrona w ramach pracy doktorskiej wykonała bardzo dużo doświadczeń, stosując przy tym całą gamę metod, w tym zaawansowaną syntezę chemiczną, spektroskopię NMR, krystalografię, polaryzację fluorescencji oraz oprogramowanie do projektowania ligandów. Chciałbym podkreślić, że opanowanie nowych technik jest bardzo istotne na tym etapie rozwoju naukowego.

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

- str. 9, 7 linijka od góry, brak dalszego ciągu zdania: *The main...*
- powierzchnię należy podawać w Å² (str. 23),
- str. 29: K_D: 4.6 μm!

Podsumowując, moja ocena przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej mgr Ewy Wrony zatytułowanej: „Small-molecule inhibitors of the Mdm2-p53 protein-protein interaction” 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 Wrony do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Jacek Otlewski