

Wrocław, 2017-05-18

Dr hab. Piotr Stefanowicz

tel. 71 375 7213

[piotr.stefanowicz@chem.uni.wroc.pl](mailto:piotr.stefanowicz@chem.uni.wroc.pl)

## O C E N A

### rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Fortuny

#### pt. „Projektowanie i synteza inhibitorów oddziaływania białko-białko dla układów menina-MLL i p53-MDM2”

Pani mgr Paulina Fortuna wykonała pracę doktorską zatytułowaną: **„Projektowanie i synteza inhibitorów oddziaływania białko-białko dla układów menina-MLL i p53-MDM2”** pod kierunkiem naukowym dr hab. Łukasza Berlickiego na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej.

Praca doktorska będąca przedmiotem tej recenzji dotyczy poszukiwania substancji modyfikujących oddziaływania onkogennych białek MLL i MDM2. Wcześniejsze, opisane w literaturze naukowej badania wykazały, że oba te białka mają kluczową rolę w rozwoju niektórych nowotworów, a blokowanie ich oddziaływań ma duży potencjał terapeutyczny. Zaplanowane badania obejmowały projektowanie inhibitorów oddziaływania menina-MLL i p53-MDM2, syntezę zaprojektowanych peptydów a także badanie ich aktywności biologicznej oraz preferencji konformacyjnych. Kompleksy wybranych substancji (zwykle o wysokich aktywnościach) zostały poddane badaniom rentgenostrukturalnym, co być może umożliwi dalszą optymalizację struktur inhibitorów i otrzymanie analogów o jeszcze wyższej aktywności.

Ten ambitny projekt badawczy został zrealizowany we współpracy z zespołami badawczymi prof. Grembeckiej (menina-MLL) i prof. Holaka (p53-MDM2). Dzięki tej współpracy możliwe było przeprowadzenie eksperymentów dotyczących oddziaływania otrzymanych inhibitorów z odpowiednimi białkami (polaryzacja fluorescencji, NMR) a także wyznaczenie struktur rentgenowskich kompleksów białek z inhibitorami.

Udział Doktorantki w prowadzonych badaniach polegał na przeprowadzeniu projektowania serii inhibitorów z wykorzystaniem metod wspomaganych komputerowo, i przeprowadzeniu syntezy tych substancji. Otrzymane inhibitory wykorzystywały jako bloki budulcowe  $\beta$ -aminokwasy (CpS, CpR i Cpt). Zastosowanie  $\beta$ -aminokwasów do projektowania peptydów o zdefiniowanych właściwościach konformacyjnych jest tematyką rozwijaną z dużym powodzeniem w ostatnich latach przez promotora pracy doktorskiej. Niewątpliwie realizowany w pracy doktorskiej temat

badawczy jest bardzo aktualny, ma potencjalne zastosowania aplikacyjne i znakomicie wpisuje się w tematykę badań prowadzonych przez dr hab. Łukasza Berlickiego

### **Ocena pracy**

Praca liczy 141 stron i napisana jest w zwięzły i jasny sposób. Przegląd literaturowy (57 stron) omawia trzy zagadnienia kluczowe dla prowadzonych badań: strategie projektowania cząsteczek hamujących oddziaływanie międzybiałkowe, opis układu p53-MDM2 i opis oddziaływania menina – MDM. W pierwszej części, dotyczącej projektowania inhibitorów Doktorantka w przedstawia metody umożliwiające zwiększenie aktywności i trwałości peptydów inhibitorowych. Zostały one podzielone na cyklizacje i modyfikacje szkieletu peptydowego. Każda z zaprezentowanych w tym rozdziale strategii jest zilustrowana przez przykład inhibitora oddziaływań białko-białko. W części opisującej badane układy znajduje się charakterystyka biologiczna i strukturalna białek biorących udział w oddziaływaniach, a także przykłady znanych już inhibitorów oddziaływań p53-MDM2 i menina –MDM.

Wszystkie informacje zawarte tej części są celowe i przyczyniają się do lepszego zrozumienia rozprawy. Przykłady istniejących już inhibitorów badanych oddziaływań, podane wraz z wartościami  $IC_{50}$  pozwalają lepiej ocenić w jakim stopniu inhibitory zaprojektowane przez Doktorantkę stanowią postęp w badaniach nad już inhibitorami oddziaływań p53-MDM2 i menina–MDM natomiast przedstawiane dane strukturalne pomagają w zrozumieniu procesu projektowania aktywnych biologicznie cząsteczek.

Cele pracy są jasno i jednoznacznie określone. Dotyczą one opracowania dla układów p53-MDM2 i menina–MDM peptydowych inhibitorów oddziaływań międzybiałkowych. Celem zwiększenia aktywności inhibitorów oraz ich stabilności w obecności proteaz zastosowano usztywnienie przez cyklizację oraz przez wprowadzenie  $\beta$ -aminokwasów.

Część eksperymentalna napisana jest szczegółowo i zawiera wszystkie dane niezbędne do odtworzenia wykonanych eksperymentów. Praca eksperymentalna rozpoczyna się od syntezy  $\beta$ -aminokwasów. Synteza wykorzystująca jako substrat kwas adypinowy jest prowadzona w sposób stereoselektywny i umożliwia otrzymanie izomerów CpS, CpR i CpT kwasu aminocyklopentanokarboksylowego.

Synteza peptydów prowadzona była częściowo manualnie w polipropylenowych rektorkach strzykawkowych, częściowo zaś z wykorzystaniem automatycznego syntezyzatora peptydów. Do kondensacji zastosowano HBTU oraz układ DIC-oxyma. Cyklizacje peptydów zostały

przeprowadzone z wykorzystaniem reakcji metatezy. Uzyskany produkt zawierający wiązanie podwójne był poddawany redukcji.

Dane analityczne dotyczące otrzymanych substancji w przekonujący sposób potwierdzają czystość i jednorodność uzyskanych peptydów. Charakterystyka analityczna otrzymanych substancji (łącznie 116 peptydów) została przedstawiona w tabeli 14. Zawiera ona pełen komplet danych analitycznych a także szczegóły oczyszczania wszystkich substancji. Wszystkie zaprojektowane peptydy zostały zatem z powodzeniem zsyntezowane. Badania otrzymanych peptydów obejmowały bezpośrednie oznaczenie ich wpływu na tworzenie kompleksów menina-MLL i p53-MDM2 prowadzone techniką pomiaru polaryzacji fluorescencji a także w niektórych przypadkach wykorzystując miareczkowanie NMR białka peptydem. Analiza preferencji konformacyjnych peptydów była prowadzona techniką dichroizmu kołowego. Przeprowadzono też ocenę stabilności peptydów w obecności chymotrypsyny, monitorując reakcję hydrolizy z wykorzystaniem HPLC. Badania aktywności biologicznej pozwoliły na dalszą optymalizację struktur inhibitorów. Optymalizacja doprowadziła do otrzymania serii peptydów, których aktywności znacząco przekraczały związki opisane w dotychczasowej literaturze (dla oddziaływania p53-MDM2 peptyd 79 wykazał  $K_i$  0.4 nM, zaś dla oddziaływania menina-MLL najaktywniejszy peptyd wykazywał  $IC_{50}$  19nM). Dodatkowo najaktywniejszy peptyd 79 wykazał bardzo dużą odporność na proteolizę, co pozwala przypuszczać, że będzie on stabilny *in vivo*. Badania rentgenostrukturalne zostały przeprowadzone dla kompleksów wybranych peptydów z meniną wskazując, że mechanizm oddziaływania syntetycznych analogów jest zbliżony do natywnego peptydu (zwłaszcza środkowa część łańcuch peptydowego syntetycznych inhibitorów np. 93 przyjmuje konformację bardzo zbliżoną do konformacji natywnego peptydu w kompleksie). Otrzymano też i zbadano strukturę kompleksu białka p53 z 68, wskazując na wpływ reszty CpR na usztywnienie łańcucha polipeptydowego w jego C-końcowej części i ukierunkowanie Pro12 w stronę reszt lizyny w białku p53. Można zatem jednoznacznie stwierdzić, że przeprowadzone badania zakończyły się sukcesem i doprowadziły do wyników, które są ciekawe poznawczo i mogą znaleźć praktyczne zastosowanie w projektowaniu substancji aktywnych biologicznie.

Jednak, jak to zwykle bywa, podczas lektury pracy nasuwa się kilka pytań i komentarzy.

1. Projektowanie cząsteczek hamujących oddziaływania międzybiałkowe stanowi bardzo istotną część rozprawy, jednak w pracy nie udało mi się znaleźć informacji jakie metody obliczeniowe oraz programy zostały zastosowane do projektowania aktywnych biologicznie cząsteczek. W rozprawie prezentowana jest bardzo dobra grafika molekularna, nie wiadomo jednak na jakiej drodze wygenerowana
2. Rys 21 przejście 37-38 pomija etap redukcji substratu borowodorkiem sodu. (jednak w opisie eksperymentu ten odczynnik jest wymieniony)

3. Dane dotyczące pomiarów polaryzacji fluorescencji nie precyzują jaki fluorofor został wykorzystany w badaniach. Czy zastosowano naturalną fluorescencję białka (np. reszty Trp) czy też zastosowano jakiś rodzaj znacznika fluorescencyjnego?
4. Na stronie 77 Doktorantka stwierdza że zwiększenie liczby reszt  $\beta$ -aminokwasów do 4 stabilizuje konformację heliakalną. Jednak zaprezentowane widma CD odbiegają od standardowych widm układów heliakalnych, i nie jest dla mnie jasne jaki rodzaj helisy jest tu postulowany.

Uwagi powyższe nie wpływają na moją wysoką ocenę rozprawy doktorskiej. Proporcje pomiędzy poszczególnymi częściami pracy są dobrze wyważone a całość napisana jest przejrzysto i przeważnie dobrym, poprawnym językiem. Potknięcia stylistyczne i terminologiczne (występujące głównie w części teoretycznej) są bardzo nieliczne, i nie utrudniają zrozumienia tekstu. Poniżej zamieszczam kilka przykładów mniej udanych sformułowań:

Str 11 ..... Niestety odkrycie nowych syntetycznych inhibitorów oddziaływania białko-białko jest bardzo trudnym zadaniem wynikającym z konieczności dopasowania niskocząsteczkowych związków .....

Str 12 .....Mają one wiele zalet.....m.in. dostępna synteza.....

Str 23..... Będących lustrzanymi odbiciami w porównaniu do  $\alpha$ -L-peptydydów.....

Str 23..... posiadają niestety liczne cechy nieporządane.....

Bibliografia (175 pozycji) jest przygotowana w sposób jednolity i staranny. Uwzględnia najnowsze publikacje aż do roku 2016. Większość prac uwzględnionych w bibliografii powstała po roku 2000 co świadczy że tematyka pracy doktorskiej jest aktualna i budzi powszechne zainteresowanie w środowisku naukowym

Według bazy Web of Science, dotychczasowy dorobek naukowy Doktorantki obejmuje jedną opublikowaną pracę, ale w bardzo prestiżowym czasopiśmie (Angewandte Chemie). Jakość wyników które znalazły się w rozprawie pozwala jednak przypuszczać, że w niedługim czasie ukażą się dalsze publikacje, których współautorką będzie Pani Paulina Fortuna

Podsumowując, stwierdzam, że badania przeprowadzone przez Doktorantkę odpowiadają na pytania postawione w celu pracy zaś eksperymenty zostały zaprojektowane i wykonane starannie oraz przedstawione w przejrzysty sposób. Literatura obejmuje najnowsze prace i cytowana jest w sposób jednolity i konsekwentny. Wykonana przez Panią Mgr Paulinę Fortunę i przedłożona mi do recenzji praca pt. „**Projektowanie i synteza inhibitorów oddziaływania białko-białko dla**

**układów menina-MLL i p53-MDM2”** spełnia wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim określone przez Ustawę o Stopniach i Tytule Naukowym z dnia 18 marca 2011 jak również wymogi zwyczajowe. Dlatego wnoszę o jej przyjęcie oraz dopuszczenie Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na wysoki poziom naukowych zaprezentowanych badań, ich interdyscyplinarny charakter i potencjalnie dużą użyteczność wyników zwracam się z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Fortuny.

Dr hab. Piotr Stefanowicz, prof. UWr

