



Wroclaw, 4.09.2018

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 Sylwii Krzanik, pt.: "Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions in the anticancer therapy"**

Praca doktorska mgr Sylwii Krzanik została wykonana w Zespole Biologii Chemicznej i Projektowania Leków Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego, pod opieką prof. Tadeusza Holaka. W pracy przedstawiono badania dotyczące poszukiwań małowzrostkowych inhibitorów oddziaływań białko-białko, które miałyby potencjalne zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej. Doktorantka zajmowała się trzema układami oddziałujących białek: p53/MDM2, USP2a/cyklina D1 oraz PD-1/PD-L1.

W organizmach żywych oddziaływania białko-białko pełnią kluczową funkcję w kontrolowaniu praktycznie wszystkich zachodzących procesów. W ludzkim interaktomie opisano do tej pory kilkanaście tysięcy binarnych oddziaływań białko-białko i jest to obszar badań, który wymaga jeszcze dużego nakładu pracy do całkowitego poznania. W szczególności ciekawe są zmiany w systemie oddziaływań białko-białko w stanach chorobowych. Udowodniono, że wiele rodzajów nowotworów efektywnie rozwija się dzięki zmianom w interaktomie. Specyficzne wpływanie na oddziaływania białko-białko może więc stanowić skuteczną strategię terapeutyczną przeciw nowotworom. Jednakże znalezienie skutecznych inhibitorów oddziaływania białko-białko nie jest proste – w większości przypadków białka

oddziałują dużą powierzchnią i klasyczne metody projektowania małowcząsteczkowych inhibitorów zawodzą. W tym kontekście tematyka podjęta przez Doktorantkę jest niezwykle ważna i jednocześnie ciekawa z naukowego punktu widzenia.

Praca doktorska mgr Sylwii Krzanik została napisana w języku angielskim z wyjątkiem trójstronicowego streszczenia w języku polskim. Rozprawa ma 104 strony i jest podzielona w sposób klasyczny na: cel (2 strony), wstęp (31 stron), materiały i metody (11 stron), wyniki (32 strony), podsumowanie (1 strona) i referencje literaturowe.

Rozprawa jest napisana jasnym i precyzyjnym językiem a dane są przedstawione i przedyskutowane bez zbędnej rozwlekłości. Poziom edycji jest dobry, choć jest konieczne jest wskazanie kilku istotnych niedociągnięć:

- (A) W całej pracy bardzo razi zapis wzorów związków chemicznych — w większości są to słabej jakości kopie z oryginalnych prac, co powoduje, że każda struktura jest narysowana w innym stylu. Nawet w wynikach własnych Doktorantki związki są rysowane w różny sposób, np. w Tabeli 3 sposób przedstawienia podstawników R1 i R2 znacząco się różni.
- (B) Doktorantka stara się stosować konwencję wytłuszczania numerów związków, tabeli i rysunków, jednakże w wielu miejscach ten sposób zapisu nie jest zachowany (np. akapit 2 strona 75). Podobnie nie udało się zachowanie konwencji w przypadku indeksów dolnych/górnych —  $K_i$  lub  $K_i$ ,  $R_1$  lub  $R_1$ , itp.
- (C) Opis związków w tabelach 3 i 4 jest mało czytelny. W tabeli 3 z notatki w tytule dowiadujemy się, że ogólna struktura znajduje się na Rysunku 25 i dodatkowo w przypisie na dole tabelki wyjaśniono, że niektóre związki są estrami a niektóre kwasami. Rozszyfrowanie tabelki 4 także wymaga uważnej lektury – w tabelce przedstawiono tylko jeden z podstawników a drugi opisano w przypisie, dodatkowo niektóre związki także są estrami a niektóre kwasami.
- (D) Część wykresu na Rysunku 34C dla związków **1** i **19** jest także przedstawiona na rysunku 33C. Na Rysunkach 33c i 34c nie wyjaśniono, co oznaczają liczby pod wykresami.
- (E) Tytuły rozdziałów i podrozdziałów nie powinny być kończyć się kropką (nie są to zdania).
- (F) Dla wielu rysunków ich podpisy znajdują się na kolejnej stronie (Rys. 33, 34, 46 itd.).

We wstępie Doktorantka opisuje trzy badane układy oddziaływujących białek, ich rolę w stanach nowotworowych oraz wybrane inhibitory tych oddziaływań. Największą uwagę

Doktorantka poświęca oddziaływaniu p53/MDM2 i jego inhibitorom, co oczywiście jest związane z szerokim zakresem dotychczas opublikowanych badań. Opis pozostałych dwóch układów białek, tj. USP2/cyklina D1 oraz PD-1/PD-L1 jest znacznie mniej obszerny (3 strony każdy) a przedstawienie znanych inhibitorów jest jedynie krótką notką bez wzorów chemicznych, co wydaje się być niewystarczające.

Materiały i metody są opisane z poziomem szczegółowości odpowiednim dla prac naukowych. Doktorantka dokładnie wypisuje wszystkie odczynniki, materiały wraz z ich producentami a także skrupulatnie przedstawia procedury eksperymentalne.

Główną część wyników stanowią badania dotyczące dwóch grup inhibitorów oddziaływania p53/MDM2: 1,5-dipodstawionych tetrazoli i 1,4,5-tripodstawionych imidazoli. W obu przypadkach opis zaczyna się od przedstawienia syntezy związków oraz wyników aktywności względem czystych białek. Na podstawie zawartości części eksperymentalnej oraz podziękowań Autorki wnioskuję, że te badania były wykonane przez innych członków zespołu naukowego. Dobrze jednak byłoby jednoznacznie wskazać autorów tych wyników. Związki z serii 1,5-dipodstawionych tetrazoli nie powodowały akumulacji białek Mdm2 i p21, ale wśród 1,4,5-tripodstawionych imidazoli znaleziono związki aktywne w badanym modelu komórkowym. Związki z drugiej grupy powodowały nie tylko akumulację Mdm2 i p21, ale także zmniejszały fazę S cyklu komórkowego, wykazywały selektywność względem komórek zawierających białko p53, oraz wykazywały aktywację p53 w testach z lucyferazą. Kompleksowe przebadanie tej grupy związków na poziomie komórkowym i wykazanie ich skuteczności w zastosowanych modelach komórkowych uważam za najważniejszy wynik zawarty w diskutowanej rozprawie. W tej części rozprawy brakuje pogłębionej dyskusji wyników, która omawiałaby korelację wyników na czystych białkach z wynikami na komórkach i wskazywała możliwe przyczyny obserwowanych aktywności.

Kolejny rozdział dotyczący inhibitorów USP2a/cyklina D1 przynosi znacząco mniej wyników. Rozdział rozpoczyna się od podsumowania wyników testów przesiewowych i optymalizacji otrzymanych struktur. Tak jak poprzednio, ta część powinna być opatrzona notatką wskazującą wykonawców opisanych badań. Aktywność na poziomie komórkowym była przetestowana przez Doktorantkę dla dwóch związków: STD1 i STD1T. Związek STD1T wykazywał silne hamowanie wzrostu komórek HCT116 i MCF-7 a także obserwowalne było zahamowanie ekspresji cykliny D1.

Trzecia część wyników dotyczy badań inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1. Struktury badanych związków były wybrane spośród małowzrostkowych inhibitorów

opatentowanych przez Bristol-Myers-Squibb. Pomimo dużego nakładu pracy eksperymentalnej nie udało się Doktorantce wykazać ich wpływu na ludzkie limfocyty T. Czy można wskazać przyczyny takiego wyniku eksperymentów?

Podsumowując, stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Sylwii Krzanik 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 Sylwii Krzanik do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

*Juliusz Belina*