



Prof. Jacek Otlewski

Wrocław, 25 kwietnia 2019 r.

Ocena pracy doktorskiej mgr Aleksandry Pęczak zatytułowanej „Poszukiwanie i charakterystyka nowych inhibitorów oddziaływania białek MDM2/MDMX z białkiem p53”

Wiodącym nurtem współczesnej biotechnologii jest specyficzne blokowanie oddziaływań makrocząsteczek, zwykle typu białko-białko, z zastosowaniem bądź przeciwciał, bądź związków niskocząsteczkowych. W szczególności, rozdzysocjowanie niektórych z kluczowych dla funkcjonowania komórki rakowej oddziaływań okazuje się efektywną metodą terapii przeciwnowotworowych. Proces poszukiwania antagonistów oddziaływań białko-białko jest jednak żmudny i, mimo przeznaczenia na badania znacznych środków finansowych, opracowywanie nowych leków przez koncerny i firmy farmaceutyczne przebiega stosunkowo wolno.

Kompleksy białka p53 z MDM2 lub MDMX są od lat rozpoznanymi celami molekularnymi, uważanymi za kluczowe dla opracowania szeroko stosowanej terapii przeciwnowotworowej z użyciem antagonistów niskocząsteczkowych. Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Aleksandry Pęczak wpisuje się w nurt poszukiwań kandydatów na leki skutecznie blokujące te oddziaływania. Badania objęte doktoratem dotyczą bardzo ważnego zagadnienia z punktu widzenia zarówno badań podstawowych, jak i stosowanych. w szczególności przeprowadzona selekcja aptamerów DNA, jako antagonistów oddziaływania p53-MDM2, jest podejściem oryginalnym i mało dotąd eksploatowanym.

Praca doktorska mgr Aleksandry Pęczak to napisany po polsku maszynopis liczący 192 stron, podzielony na rozdziały: Wstęp, Cele pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i Bibliografia. Doktorat zawiera także podziękowania, wykaz skrótów i symboli oraz streszczenia w językach polskim i angielskim.

Rozdział Wstęp jest bardzo obszerny, ale jednocześnie napisany w zwarty i treściwy sposób, dostarczając ogromnej ilości informacji na temat związany z molekularnymi podstawami transformacji nowotworowej, ze szczególnym podkreśleniem genów supresorowych. Doktorantka szczegółowo omawia białko p53, jego strukturę i rolę w funkcjonowaniu komórki. Następnie w podobny sposób przedstawione są: białka MDM2 i MDMX i wzajemne sieci ich oddziaływań z białkiem p53 oraz struktura odpowiednich kompleksów. Tą część Wstępu dopełnia przegląd niskocząsteczkowych antagonistów omawianych oddziaływań, opracowywanych przez koncerny farmaceutyczne. Oddzielna część Wstępu stanowi wprowadzenie do aptamerów, opis procesu ich selekcji, możliwości zastosowań, z szerokim przedstawieniem aptamerów o potencjale terapeutycznym. Rozdział Wstęp napisany jest bardzo kompetentnie i zilustrowany oryginalnymi rysunkami doktorantki.

Najważniejszą częścią doktoratu jest oczywiście rozdział Wyniki. W zgodzie z celami pracy, doktorantka przedstawia dane dotyczące optymalizacji testów przesiewowych opartych o technikę polaryzacji fluorescencji (FP), badania pochodnych związków SJ oraz selekcję aptamerów DNA względem N-końcowej domeny białka MDM2. Są to więc w zasadzie trzy stosunkowo odrębne grupy wyników.

Pierwsza grupa danych dotyczy opracowania metody pozwalającej na szybkie przeszukanie dużej liczby cząsteczek blokujących oddziaływanie p53 z MDM2 i z MDMX. Doktorantka wybrała odpowiedni peptyd (P4), oryginalnie odkryty w wyniku selekcji fagowej, który, po wyznakowaniu fluorescencyjnym, zastosowała jako imitujący miejsce oddziaływania p53 z MDM2/X i dogodny do optymalizacji metody FP. W serii dalszych badań doktorantka z powodzeniem zoptymalizowała rodzaj plastiku, z którego wykonane są płytki, wpływ stężenia DMSO, stabilność pomiarów FP w czasie, tzw. okno pomiarowe, i wyznaczyła parametr  $Z'$  opisujący powtarzalność pomiarów. Były to badania żmudne, ale jak najlepiej świadczące o solidnym podejściu mgr Pęczak do uzyskania wiarygodnych wyników.

Druga część wyników dotyczy badań nad opisanymi w literaturze niskocząsteczkowymi antagonistami oddziaływania p53-MDMX z rodziny SJ. Doktorantka podjęła się rozbudowy rdzenia cząsteczek związków SJ i zmierzenia ich powinowactwa wobec MDM2 i MDMX. Badania doktorantki przybrały jednak niespodziewany obrót, gdyż pokazała ona, iż związki SJ są reaktywne chemiczne i modyfikują kowalentnie grupy sulfhydrylowe cystein białek MDM2/X. Mimo, że mgr Pęczak nie udało się zoptymalizować struktury związków SJ pod kątem zwiększenia ich powinowactwa wobec obu białek, to wykazała się ona należyłą dociekliwością, udowadniając metodą spektrometrii mas ich reaktywność chemiczną.

Najciekawsze wyniki przedstawione w doktoracie dotyczą selekcji aptamerów DNA wiążących białko MDM2. Jest to podejście nowe, gdyż dotychczas nieznane były takie aptamery. Mgr Pęczak zastosowała klasyczną technikę SELEX i przeprowadziła liczne selekcje w zmiennych warunkach. Wyselekcjonowane 90-nukleotydowe aptamery, po skróceniu do 35-nukleotydów, wykazywały powinowactwo do MDM2 w zakresie stężeń mikromolowych. Jeden z aptamerów, Mot1MOD, zastosowany w stężeniach mikromolowych, zdolny był do obniżenia żywotności linii komórkowej A549 (p53<sup>+/+</sup>), ale nie linii kontrolnej PC-3 (p53<sup>-/-</sup>).

Oceniając doktorat, chciałbym zaważyć bardzo duży wkład pracy doktorantki, zastosowanie szeregu odmiennych technik (techniki biologii molekularnej, biologii komórki, liczne techniki biofizyczne pomiarów stałych dysocjacji wraz z analizą statystyczną, analizy spektrometrii mas, selekcja aptamerów *in vitro*). Rozprawa napisana jest starannie i właściwie zilustrowana. Podział doktoratu na poszczególne rozdziały przeprowadzony jest prawidłowo i zawiera stosunkowo mało powtórzeń zdań czy myśli. Oceniając całościowo, rozprawa jest dojrzałym opracowaniem naukowym, gdyż zestawia trzy niezależne grupy wyników, których otrzymanie wymagało odmiennych kompetencji.

Chciałbym teraz przedstawić pewne drobne uwagi krytyczne do omawianej rozprawy doktorskiej:

1. W pracy jest sporo błędów interpunkcyjnych; występują też nieliczne błędy typograficzne i ortograficzne. Zauważyłem też błędy składniowe (np. str. 42: odkryte przez Holak

i współpracowników) czy stylistyczne (np. str. 43: ciężko ocenić; str. 61 nowe indykacje; str. 153: administrowanie wielokrotne).

2. Autorka używa często terminu „struktury krystalograficzne” zamiast „struktury krystaliczne”. Podobnie metoda Bradforda, a nie metoda Bradford, gdyż Marion M. Bradford był mężczyzną.
3. Str. 12: czy peptyd jest fragmentem białka p53, czy też został wyselekcjonowany?
4. Str. 38: nanocząstkowy liposomowy kompleks, a nie nanocząsteczkowy.
5. Str. 50: selekcja przeciwciał niekoniecznie wymaga immunizacji zwierząt, gdyż obecnie często stosuje się selekcję z bibliotek fagowych ludzkich sekwencji przeciwciał.
6. Co oznacza określenie „cel☺” (str. 77)?
7. Str. 80: czy  $K_d=10^{-15}$  jest wartością bezwymiarową?

Podsumowując, stwierdzam, że moja ocena rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Pęcak zatytułowanej „Poszukiwanie i charakterystyka nowych inhibitorów oddziaływania białek MDM2/MDMX z białkiem p53” jest wysoce pozytywna, a opracowanie spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim i ujęte stosownymi przepisami. Wnoszę do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Aleksandry Pęcak do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

