



## 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)

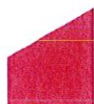
Wrocław, 12 kwietnia 2017 r.

Ocena pracy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Twardej-Cłapy pt. "Small-molecule inhibitors of the p53-Mdm2/MdmX interaction as basis of anticancer therapy. Determination of the crystal structure of FAS1 domain of the hyaluronic acid receptor Stab2."

Praca doktorska mgr inż. Twardej-Cłapy dotyczy testowania możliwości terapii przeciwnowotworowej z zastosowaniem dwóch modeli biologicznych. W pierwszym przypadku doktorantka poszukiwała antagonistów oddziaływania p53-Mdm2/MdmX. Jako supresor transformacji nowotworowej, białko p53 jest kluczowym czynnikiem chroniącym komórkę ludzką przed wejściem na ścieżkę nowotworzenia. Stąd ogromne zainteresowanie firm farmaceutycznych opracowaniem antagonistów oddziaływania p53 z białkami Mdm2 i MdmX, które są jego negatywnymi regulatorami, nadprodukowanymi w komórkach nowotworowych. Poszukiwanie antagonistów oddziaływania p53-Mdm2/MdmX ma już wieloletnią historię, a promotor ocenianego doktoratu, Profesor Holak, duże doświadczenie i sukcesy w tych badaniach.

Druga, znacznie mniejsza część doktoratu, poświęcona jest badaniom strukturalnym receptora kwasu hialuronowego Stab 2, który uczestniczy w usuwaniu z krwioobiegu szeregu ligandów, między innymi kwasu hialuronowego i heparyny. Blokowanie receptora z użyciem przeciwciał zwiększa poziom kwasu hialuronowego i zmniejsza ilość przerzutów nowotworowych. Podczas gdy wiedza o strukturze kompleksów p53-Mdm2/MdmX jest ogromna, brak jest danych strukturalnych na temat białka Stab2. Co więcej wiedza na temat mechanizmu przekazywania sygnału przez receptor Stab2 jest niewielka, tak więc jej poszerzenie w ramach przeprowadzonych w doktoracie badań jest jak najbardziej uzasadnione.

Rozprawa doktorska mgr inż. Aleksandry Twardej-Cłapy została przygotowana w języku angielskim i liczy 136 stron. Doktorat zawiera Streszczenia w języku angielskim i polskim, Wstęp, Cele pracy, Materiały, metody i procedury, Wyniki i dyskusję, Wnioski oraz Literaturę. Ponadto, na końcu doktoratu dołączony jest Appendix zestawiający na sześciu stronach zastosowane metody syntezy kilku klas związków.



We Wstępie doktorantka opisuje ścieżki sygnalizacyjne, w których uczestniczy białko p53, przedstawia jego strukturę i mechanizmy kontroli przez białka Mdm2 i MdmX w procesie nowotworzenia. Doktorantka prezentuje też znane niskocząsteczkowe inhibitory oddziaływania p53-Mdm2/MdmX w terapii przeciwnowotworowej, które testowane są w badaniach klinicznych. Na końcu Wstępu opisuje receptor kwasu hialuronowego Stab2, będący wielodomenowym białkiem zbudowanym z 2551 reszt aminokwasowych, i jego udział w procesie przerzutowania.

Najważniejszy rozdział doktoratu to oczywiście Wyniki i dyskusja. Doktorantka zsyntetyzowała inhibitory oddziaływania p53-Mdm2/MdmX oparte na różnych ugrupowaniach chemicznych: imidazolach, 2-furanonach, 3-pirolin-2-onach,  $\alpha$ -aminoacylamidach, tetrazolach, bisindolach,  $\beta$ -laktamach i makrocyklach. Do projektowania związków doktorantka zastosowała platformę AnchorQuery. Stosując szereg odmiennych metod, w tym polaryzację fluorescencji, termoforezę oraz spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego wyznaczyła bardzo dużą liczbę stałych wiązania zsyntetyzowanych związków do Mdm2 i MdmX. Wartości stałych wiązania były w zakresie stężeń mikromolowych. Dla najsilniej wiążących się podjęła próby krystalizacji i rozwiązała struktury w kompleksie z Mdm2. Doktorantka zaobserwowała oryginalny sposób dimeryzacji Mdm2 zarówno w kryształach, jak i w roztworze.

W niezależnej serii badań na liniach komórkowych mgr inż. Twarda-Clapa zbadła wpływ wybranych związków na hamowanie wzrostu i zatrzymanie cyklu komórkowego, potwierdzając, że jeden ze związków z grupy pochodnych imidazoli wykazał silną inhibicję wzrostu komórek nowotworowych.

Ja już napisałem, część badań dotycząca receptora Stab2 jest dużo mniejsza. Za sukces należy uznać określenie z rozdzielczością 1.48 Å struktury krystalicznej domeny FAS1 tego receptora. Należy zaznaczyć, że jest to pierwsza struktura przestrzenna dla fragmentu tego białka.

Dyskusja uzyskanych wyników w kontekście dostępnych danych literaturowych jest prawidłowa. Rozprawa znacząco poszerza naszą wiedzę na temat rozdysocjowania oddziaływania p53-Mdm2/MdmX z zastosowaniem antagonistów niskocząsteczkowych. Bardzo wartościowe są dane strukturalne o budowie domeny FAS1 receptora kwasu hialuronowego Stab2.

Rozprawa napisana jest poprawnym angielskim, choć autorka nie ustrzegła się błędów syntaktycznych czy niezgrabności językowych. Praca jest starannie zredagowana i zilustrowana.

Uwagi do doktoratu:

- uwaga ogólna: prosiłbym, aby w czasie publicznej obrony doktorantka, które z doświadczeń wykonała samodzielnie, a które wynikają z pracy zespołowej,
- prawidłowy termin to spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego, a nie jądrowego rezonansu magnetycznego (str. 11),
- stałą wiązania compound 19 - MdmX trudno wyznaczyć z punktów na wykresie (Figure 4.6), można ją jedynie oszacować.

Doktorantka jest współautorem ośmiu publikacji, z czego pięciu związanych z tematyką doktoratu. Dwa kolejne manuskrypty znajdują się w recenzji. Jest to bardzo dobry wynik, choć należy zauważyć, że jedynie w przypadku pracy będącej w recenzji w *J. Med. Chem.* doktorantka jest pierwszym autorem.

Podsumowując, moja ocena recenzowanej pracy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Twardej-Cłapy jest wysoce pozytywna, a rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim. W związku z tym wnoszę do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Aleksandry Twardej-Cłapy do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Ze względu na wysoki poziom doktoratu oraz opublikowanie jego wyników wnoszę o jego wyróżnienie.

Jacek Otlewski

