



Recenzja 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 the FAS1 domain of the hyaluronic acid receptor Stab2”

Praca doktorska pani Aleksandry Twardej-Cłapy dotyczy projektowania potencjalnych leków przeciwnowotworowych w oparciu o testy biochemiczne i badania strukturalne. Jest ona częścią większego projektu, realizowanego przez kilka grup badawczych, koordynowanego przez profesora Tadeusza A. Holaka, który jest bezpośrednim promotorem tego doktoratu. Część badań była realizowana przez doktorantkę pod opieką dr hab. Grzegorza Dubina, który pełni funkcję promotora pomocniczego.

Praca jest napisana w języku angielskim z załączonym streszczeniem zarówno w języku angielskim, jak i w polskim. Podzielona jest na 5 głównych paragrafów: Wprowadzenie, Cel pracy, Materiały, metody i procedury, Rezultaty i Dyskusja oraz Podsumowanie. Zawiera również Apendix z opisem syntezy badanych inhibitorów, spisem skrótów, rysunków, tabel i literatury.

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było zaprojektowanie inhibitorów zapobiegających oddziaływaniu białka p53 z białkami regulatorowymi Mdm2 i MdmX, które to kontrolują jego aktywność. Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym zapobiegającym wejściu komórki na drogę nowotworzenia. Ten czynnik transkrypcyjny reguluje cały szereg procesów wewnątrzkomórkowych, między innymi: zatrzymanie cyklu komórkowego i naprawę DNA. W warunkach stresowych białko Mdm2 indukuje swoją własną degradację oraz homologicznego białka MdmX, prowadząc do aktywacji białka p53, co z kolei wyzwala transkrypcję genów kontrolowanych przez to białko. Zapobieżenie oddziaływaniu białek Mdm2/MdmX z tetramerem białka p53 jest potencjalnym kierunkiem terapii w wielu chorobach nowotworowych. Analiza oddziaływań białko - ligand stanowi podstawę do projektowania kolejnych inhibitorów o lepszych właściwościach.

Oddziaływanie między białkiem p53 a białkami Mdm2 i MdmX polega na przyłączeniu helikalnego fragmentu białka p53 do hydrofobowej bruzdy występującej w obydwu tych białkach. Oddziałująca helisa pochodzi z N-terminalnej domeny TAD (*transactivation domain*) białka p53, a kluczowe w oddziaływaniach reszty to: Phe19, Trp23 i Leu26. Małocząsteczkowe inhibitory, naśladujące oddziaływanie tego fragmentu z białkami Mdm2 i MdmX, zwiększają stężenie aktywnej formy białka p53 i indukują transkrypcję genów supresorowych.

W ramach projektu Doktorantka sprawdzała aktywność biologiczną szeregu inhibitorów białek Mdm2 i MdmX. Związki te były syntezowane przez grupy z Wydziału Chemicznego UJ w Krakowie i Departamentu Projektowania Leków, Uniwersytetu w Groningen, Holandia. Inhibitory te były oparte na centralnym fragmencie o różnej naturze chemicznej: imidazoli, furanonów, 3-pyrolino-2-ketonów, bisindoli, tetrazoli, α -amino-acylo-amidów, β -laktamów i macrocykli. Wszystkie te związki zawierają pierścień indolu przyłączony do centralnego fragmentu, naśladujący oddziaływanie reszty bocznej tryptofanu (Trp23) z domeny TAD. Pozostałe modyfikacje związków polegały na wprowadzeniu podstawników będących analogami fenyloalaniny (Phe19) i leucyny (Leu26). Dodatkowo budowa ich centralnego fragmentu umożliwia odpowiednie steryczne rozmieszczenie poszczególnych podstawników. Oddziaływania zsyntezowanych inhibitorów z białkami Mdm2 i MdmX były badane za pomocą fluorescencji polaryzacyjnej (FP), termoforezy mikroskalowej (MST), dwuwymiarowego magnetycznego rezonansu jądrowego ^1H - ^{15}N NMR, a dla kilku wybranych kompleksów był przeprowadzony pomiar dyfrakcyjny i rozwiązane zostały struktury krystaliczne. Aktywność inhibitorów była testowana na ludzkich liniach komórkowych poprzez badanie przeżywalności komórek, analizę cyklu komórkowego oraz testy Western Blott z użyciem przeciwciał antyMdm2.

Zakres badań opisanych w pracy jest imponujący i trudno sobie wyobrazić by w całości były wykonane przez jedną osobę. Skład autorów załączonego dorobku publikacyjnego Doktorantki świadczy o tym, że wyniki zaprezentowane w niniejszej pracy są rezultatem szerokiej współpracy z innymi naukowcami.

Białka Mdm2 i MdmX były krystalizowane z wybranymi inhibitorami w celu prześledzenia oddziaływań w bruździe wiążącej i zebraniu strukturalnych informacji do projektowania kolejnych, ulepszonych inhibitorów. Analiza oddziaływań inhibitor - białko jest przeprowadzona bardzo dokładnie i określa naturę oddziaływań odpowiedzialnych za tworzenie kompleksu, który zapobiega interakcji białka Mdm2 i MdmX z białkiem p53. Część krystalograficzna pracy zawiera dwa dodatkowe aspekty badań. Pierwszy z nich dotyczy wykrycia spontanicznej dimeryzacji białka Mdm2 indukowanej przez niektóre z inhibitorów, drugi natomiast dotyczy badań strukturalnych FAS1, fragmentu białka Stab2, będącego receptorem kwasu hialuronowego. Przeprowadzone badania na myszach wykazały, że brak białka Stab2, jak i blokowanie jego aktywności za pomocą przeciwciał, zwiększa ilość kwasu hialuronowego we krwi i ogranicza liczbę przerzutów. Badania krystalograficzne białka Stab2 dotyczą domeny FAS1 o długości 139 aminokwasów, a 2D HSQC ^1H - ^{15}N NMR pozwolił na wstępne zidentyfikowanie reszt aminokwasowych odpowiedzialnych za wiązanie kwasu hialuronowego.

Głównym celem określonych struktur krystalicznych było przeanalizowanie oddziaływań białko – inhibitor. Rozdzielczość danych dyfrakcyjnych, jak również inne parametry statystyczne procesowania danych dyfrakcyjnych i udokładniania struktur krystalicznych są bardzo dobre. Wysokiej jakości mapy gęstości elektronowej pozwoliły na idealne wmodelowanie cząsteczek inhibitorów, natomiast niektóre łańcuchy boczne reszt aminokwasowych zostały ucięte – dlaczego?

Miałam możliwość przeanalizowania struktur przestrzennych zdeponowanych w PDB przez doktorantkę i zauważyłam, że wiele z nich, szczególnie we wcześniejszych depozycjach, posiada ucięte łańcuchy boczne reszt aminokwasowych choć mapy gęstości elektronowej pozwoliłyby na ich wbudowanie i określenie dominującej konformacji. Uważam, że lepszym rozwiązaniem w przypadku gorszej jakości map gęstości elektronowej jest wbudowanie pełnego łańcucha bocznego aminokwasu w dominującej konformacji, bądź nawet fragmentu głównego łańcucha białkowego w dwóch konformacjach, co ma miejsce w strukturze FAS1, a wysokie czynniki drgań termicznych świadczą w takim przypadku o labilności konformacyjnej danego fragmentu białka.

Typowe prace doktorskie z zakresu krystalografii białek są zazwyczaj już tak obszerne, że same wystarczają na projekt doktorski. Praca doktorska pani mgr inż. Aleksandry Twardej-Cłapy jest pracą dotyczącą głównie projektowania inhibitorów - potencjalnych leków antynowotworowych, a badania strukturalne stanowią integralną, bardzo wartościową część całego projektu. Prezentowana w pracy wszechstronność i różnorodność przeprowadzonych badań świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki, którą dodatkowo potwierdza liczba 8 publikacji, w których jest współautorem, a dwie kolejne prace znajdują się w recenzji.

Praca doktorska pani Aleksandry Twardej-Cłapy ma nietypowy dla prac doktorskich układ, gdyż nie zawiera wydzielonego rozdziału „Metodyka”. Niektóre zagadnienia metodyczne można znaleźć w paragrafie „Methods and procedures” jednak są one opisane w bardzo skróconej formie, w sposób typowy dla publikacji. Część z nich nie zawiera odnośników literaturowych, co szczególnie w przypadku procedur mało mi znanych utrudniało analizę. Na przykład w paragrafie 3.2.5.5 Cell-based assays, w opisie metody oznaczania przeżywalności komórek „Cell viability assay” trudno jest dociec, jaki związek ma przeżywalność komórek z ilością powstałych kryształów formazanu i absorbancją mierzoną przy dwóch długościach fali (570 nm i 650 nm). Podobnie brakuje wyjaśnienia w analizie cyklu komórkowego „Cell Cycle analysis”, jakie znaczenie ma „trypsinized” - na czym polega ta procedura i jaki ma związek z ilością oznaczonego DNA?. Czy tu badana była cytotoksyczność tego preparatu?

W związku z brakiem opisów zjawisk fizyko-chemicznych leżących u podstaw stosowanych metod badawczych wykonywanych eksperymentów prosiłabym Doktorantkę o zwięzłe przedstawienie procesu krystalizacji makromolekuł, metod rozwiązywania problemu fazowego i dwuwymiarowego magnetycznego rezonansu jądrowego. Największą trudność w interpretacji widm 2D HSQC ^1H - ^{15}N NMR stanowi przypisanie poszczególnych sygnałów dla wszystkich nieprolinowych reszt aminokwasowych - czy doktorantka dokonywała tego przypisania sama, czy we współpracy ze specjalistami wykonującymi pomiar?. Jednocześnie jestem ciekawa w jakim stopniu w tym przypisaniu pomocna była znajomość struktur krystalicznych.

Poza tym w pracy dostrzegłam kilka niepoprawnych bądź niezręcznych sformułowań, jak np.: - „Obtained crystals were further optimized” – optymalizujemy warunki krystalizacyjne zmieniając różne parametry roztworu krystalizacyjnego by wyhodować kryształy odpowiedni do badań dyfrakcyjnych.

- Czasami domena FAS1 nazywana jest Stab2, a przecież jest to tylko mały fragment tego białka.
- Tytuł paragrafu 3.2.4.1. jest: „Protein techniques” chyba zostało przez przypadek nie dodane słowo „analysis” – czyli powinno być „Protein analysis techniques”.
- Nazwy łacińskie i stałe fizykochemiczne powinny być pisane kursywą.
- Część asymetryczna w rozwiązanych strukturach nie jest ulokowana w komórce elementarnej.
- Rysunek 4.16 jest nieczytelny: wiązania wodorowe należy przedstawiać precyzyjnie tak, by dokładnie było widać donor i akceptor, zwyczajowo cząsteczki wody oznacza się czerwoną kulką odpowiadającą atomowi tlenu (co Autorka na rys. 4.25 zastosowała), nie stosuje się cieni w rysunkach struktur.
- W spisie treści ostatni rozdział to Conclusin, natomiast w treści pracy to Overall conclusion of the thesis.

Praca napisana jest bardzo dobrym językiem naukowym. Liczba 114 pozycji i różnorodność odnośników literaturowych koresponduje z wysokim poziomem prezentowanych badań. Czytając pracę widać, że autorka wnikliwie śledziła literaturę w całym okresie wykonywania badań. Nie jest jednak cytowana literatura do prac konkurencyjnych grup badawczych pracujących nad analogicznymi lub podobnymi inhibitorami. Brakuje również porównawczej analizy strukturalnej do analogicznych kompleksów białek Mdm2 i MdmX z inhibitorami, bądź fragmentami białka p53.

W podsumowaniu stwierdzam, że pani mgr inż. Aleksandra Twarda-Ćłapa przedstawiła rozprawę doktorską posiadającą wysokie walory poznawcze, a wymienione powyżej uwagi krytyczne nie wpływają na wartość merytoryczną pracy. Doktorantka wykazała szeroką wiedzę biochemiczną oraz znajomość badań strukturalnych białek. Dysponuje solidnym i różnorodnym warształem eksperymentalnym i właściwie dobierała metody do rozwiązywania postawionych problemów badawczych. Uzyskane wyniki są oryginalne i stanowią niewątpliwie nowość naukową.

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska pani mgr inż. Aleksandry Twardej-Ćłapy spełnia wszelkie warunki stawiane pracom doktorskim zgodnie z art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003r. Nr 65 poz 595 z późniejszymi zmianami), uwzględniając Rozporządzenie MNiSW z dnia 30 października 2015 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. 2015 poz. 1842) oraz stosując kryteria zawarte w Rozporządzeniu MNiSW z dnia 1 września 2011 r. (Dz. U. nr 196, poz. 1165), dlatego stawiam wniosek o dopuszczenie pani magister inżynier Aleksandry Twardej-Ćłapy do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Dodatkowo, biorąc pod uwagę liczbę publikacji, w których Doktorantka jest współautorem oraz zakres i różnorodność przeprowadzonych badań wnioskuję o wyróżnienie jej pracy doktorskiej.

Anno Bujana