



Politechnika Wroclawska

Wydział Chemiczny

dr hab. inż. Marcin Sieńczyk, prof. uczelni
Katedra Chemii Organicznej i Medycznej
Wybrzeże Wyspiańskiego 29, bud. A-2, p. 424a
50-370 Wrocław
tel. +48 71 320 36 46
fax +48 71 320 24 27

Politechnika Wroclawska
Wydział Chemiczny
Cypriana Kamila Norwida 4/6
50-373 Wrocław
tel. +48 71 320 24 25
fax +48 71 320 21 52

Wrocław, 21 lipca 2023

Recenzja pracy doktorskiej mgr. Karola Żrubka zatytułowanej

*Charakterystyka strukturalna kinaz białkowych istotnych w procesach nowotworzenia
w kompleksach z niskocząsteczkowymi inhibitorami*

Choć od momentu wprowadzenia do terapii przeciwnowotworowej pierwszych leków upłynęło wiele lat, Nasz postęp w dziedzinie walki z nowotworami wciąż jest, niestety, niewystarczający. Także poznanie genomu ludzkiego zamiast odpowiedzi pozostawiło Nas z ogromną ilością nowych pytań i naukowych wyzwań. Natura jak zwykle okazała się być sprytniejszą od Nas, a nowotwory wciąż przejawiają swój mistrzowski kunszt efektywnego unikania mechanizmów odpowiedzialnych za ich eliminację. Jednym z istotnych zagadnień ery postgenomowej jest poznanie mechanizmów aktywacji czy regulacji działania kinaz białkowych, określenie biologicznej roli jaką pełnią w wielu kluczowych procesach życiowych, jak regulacja cyklu komórkowego, apoptoza, angiogeneza, metastaza nowotworów czy roli w sposobie komunikowania się komórek ze światem zewnętrznym. Poznanie sposobu funkcjonowania kinaz, poznanie ich roli w często krzyżujących się skomplikowanych szlakach biochemicznych zależności otwiera możliwości projektowania nowych leków, które w różny sposób mogą oddziaływać z docelowymi enzymami. Dlatego też poszukiwanie nowych związków o właściwościach przeciwnowotworowych wciąż należy do największych wyzwań współczesnej nauki. Jedną z obiecujących strategii terapeutycznych jest kontrola aktywności kinaz,



czego dowodem może być chociażby wprowadzenie do kliniki trastuzumabu czy Imatinibu. W ten nurt wpisuje się także praca doktorska Pana Karola Żrubka dotycząca badania aktywności oraz molekularnych podstaw wiązania z niskocząsteczkowymi inhibitorami kinaz MELK i PIM1. Rozprawa została wykonana na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod opieką Prof. dr. hab. Grzegorza Dubina.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska liczy 142 strony i ma układ typowy, powszechnie przyjęty dla tego rodzaju opracowań. Rozprawa składa się z pięciu głównych części (Wstęp teoretyczny, Materiały i metody, Wyniki, Podsumowanie oraz Dyskusja) poprzedzonych krótkim Streszczeniem pracy. Doktorant umieścił w swojej rozprawie 39 rysunków oraz 13 tabel, natomiast spis cytowanej literatury obejmuje 241 pozycji w większości z ostatnich piętnastu lat. Jedyne na co mógłbym zwrócić uwagę to fakt, iż zabrakło w pracy spisu stosowanych skrótów (brak spisu niestety bardzo utrudnia poruszanie się w „gąszczu nomenklatury bogatego świata kinaz”). Aby podkreślić zasadność umieszczania w tego typu opracowaniach spisu stosowanych skrótów dodam, iż w przedstawionej rozprawie na próżno szukać rozwinięcia skrótów nazw kinaz MELK i PIM1... . Ponadto, co bardzo istotne, praca nie zawiera rozdziału Cel pracy, w którym Doktorant szczegółowo i jednoznacznie przedstawiłby cele przeprowadzonych badań. W miejsce rozdziału Cel pracy Doktorant pozostawia czytelnika z dość ogólnym stwierdzeniem, że celem badań były kinazy MELK i PIM1 (rozdział Streszczenie pracy) i jedynie na podstawie przeprowadzonych eksperymentów oraz uzyskanych wyników można domyślać się, jaki był cel (co przecież nie musi być tożsame).

Zanim jednak przejdę do analizy poszczególnych części opracowania, pozwolę sobie na kilka uwag natury ogólnej. Rozprawa doktorska Pana Karola Żrubka nie została starannie opracowana pod względem edytorskim i graficznym, i choć nie wpływa to na jej ogólny odbiór, niezliczone błędy stylistyczne, gramatyczne i interpunkcyjne (przecinki pojawiają się i znikają w sposób całkowicie przypadkowy i nieprzewidywalny) utrudniają jej płynne czytanie. Niektóre zdania, ze względu na swoją konstrukcję, są trudne do zrozumienia. Wydaje mi się, iż w przygotowaniu rozprawy zabrakło ostatniego szlif w postaci solidnej korekty językowej. Równocześnie pragnę dodać, iż nie znalazłem w pracy błędów merytorycznych, a pojawiające się w rozprawie drobne błędy rzeczowe są najprawdopodobniej wynikiem bądź „kalki” z języka angielskiego, bądź „korekty” programu,



w którym przygotowano tekst rozprawy (przykładowo „kinazy fosforyzujące” zamiast fosforylujące [strona 10], „Novase” zamiast Novel [strona 13], „3-fosfoinozytolu” zamiast 3-fosfatydyloinozytolu [strona 14], „grupa pyrazolowa” zamiast pirazolowa czy „ grupy fenolowej” zamiast fenylowej [strona 96]).

Poprzedzony krótkim streszczeniem (3 strony) przegląd literatury zawarty został na 62 stronach, na których Autor przybliży czytelnikowi informacje dotyczące klasyfikacji i roli kinaz białkowych w różnych procesach, ich budowy, strukturalnych uwarunkowań do pełnienia określonej funkcji biologicznej, mechanizmie katalitycznym, a także przedstawia kilka wybranych inhibitorów kinaz (o różnym mechanizmie działania) wraz z analizą ich oddziaływania z docelowym enzymem. Pomijając potknięcia językowe, ta część pracy stanowi logiczną całość i jest dość dobrze, co nie znaczy wyczerpująco, opracowana. W pełni rozumiem prawdopodobne ambitne przesłanki Doktoranta, aby przegląd literatury objął swoim zakresem możliwie najszersze spektrum grup/rodzin kinaz, nie mniej jednak aby sprostać takiemu wymaganiu wstęp musiałby mieć kilkaset stron. Dlatego też lektura tego fragmentu rozprawy pozostawia spory niedosyt ze względu na dość dużą ogólnikowość (część dotycząca klasyfikacji kinaz). Szkoda, że Doktorant nie skupił się w głównej mierze na obszerniejszym opisie kinaz MELK i PIM1. Nie mniej jednak Wstęp teoretyczny do rozprawy pozwala czytelnikowi na rozeznanie się w problemach dotyczących tematyki pracy, szczególnie w świetle bardzo złożonych zależności sieci komunikacyjnych opartych o kinazy białkowe. Pozwolę sobie w tym miejscu na kilka drobnych uwag/sugestii z nadzieją na ich wyjaśnienie podczas publicznej obrony rozprawy:

- strona 22 – Autor opisuje dwa inhibitory (Compound 1 i OTSSP167) kinazy MELK – szkoda, że w rozprawie zabrakło ich wzorów strukturalnych (podobnie jak i wzorów innych omawianych inhibitorów – PD173074 czy BI-D1870, strona 71),
- w podpisach Rysunków 13-16 zabrakło informacji o numerach pdb źródłowych struktur białek,
- proszę o rozwinięcie stwierdzenia „ruchliwość miejsc fosforylacji” zawartego na stronie 55,
- Rysunki 19, 20 i 22 – proszę o podanie informacji na temat przedstawionych inhibitorów (odpowiednie źródła literaturowe), a dla inhibitora na Rysunku 22 także proszę o podanie jego struktury przed związaniem z docelową kinazą.



Kolejne 13 stron rozprawy stanowi rozdział Materiały i metody, w którym Autor skupia swoją uwagę na opisie otrzymywania i optymalizacji warunków ekspresji docelowych kinaz (PIM1, MELK i mutantów kinazy MELK), metodzie ich oczyszczania, analizie aktywności enzymatycznej kinazy MELK i jej mutantów, optymalizacji warunków krystalizacji kinazy PIM1 oraz na inhibitorach kinazy PIM1 wykorzystanych w badaniach, a także wykorzystanym podejściu w analizie strukturalnej uzyskanych kryształów białek. Do tej części rozprawy nie mam większych uwag (może za wyjątkiem tego, że przedstawione opisy eksperymentalne są bardzo ogólne, brak m.in. informacji o źródle wykorzystanych materiałów). Nasuwa się także kilka pytań:

- co było przesłanką do takiego, a nie innego, skrócenia sekwencji kinazy PIM1?
- proszę o rozwinięcie myśli „barwienie CBB zgodnie ze standardową metodą”,
- dlaczego nie wykonano testu aktywności enzymatycznej otrzymanej kinazy PIM1?
- w jaki sposób usunięto z układu proteazę PreScission™?
- strona 77 – jeśli reakcję enzymatyczną monitorowano przez 30 minut i pomiary dokonywano co 10 minut, to czy wykresy przygotowywano z 4 punktów? Ile wykonano eksperymentów, w ilu powtórzeniach? Proszę o przedstawienie przykładowego wykresu wraz ze stosownymi obliczeniami podczas publicznej obrony rozprawy.
- skąd pozyskano stosowane w badaniach inhibitory?

Wyniki uzyskane w trakcie prowadzonych badań zostały przedstawione na 19 stronach rozprawy. Autork rozpoczyna od przedstawienia sekwencji otrzymanych konstruktów oraz wyników (wybranych) uzyskanych podczas izolacji przedmiotowych kinaz (brak wyników dla mutantów kinazy MELK). Autor nie przedstawił wyników uzyskanych dla innych stosowanych systemów ekspresji stwierdzając jedynie, że wybrany został konkretny układ ekspresyjny, nie wyjaśniając jakie były przesłanki dla takiego wyboru. Nie znalazłem także w pracy informacji, jakie stosowano stężenia kinazy MELK (i jej mutantów) oraz jakie były stężenia dorsomorfiny? Czy przeprowadzono (a jeśli nie, to dlaczego) miareczkowanie miejsc aktywnych kinaz MELK? Szczególnie, że wyznaczony parametr IC50 zależy od warunków prowadzonego eksperymentu. Doktorant wskazał także, że przetestowano ponad



7500 warunków krystalizacyjnych (proszę o stosowne obliczenia) co dowodzi ogromu włożonej pracy eksperymentalnej. Proszę jednocześnie o wyjaśnienie, dlaczego nie wykorzystano wiedzy na temat warunków krystalizacji kinazy PIM1 opublikowanych w 2016 roku (cytowanie 229)? Być może ułatwiłoby to istotnie pracę i pozwoliło skupić uwagę na innych aspektach podjętego zagadnienia? Z czystej ciekawości zapytam także o to, czy i dlaczego nie rozważono otrzymania mutantu kinazy MELK, w którym resztę Cys89 zamieniono na resztę kwasu glutaminowego lub asparaginowego?

W dalszej części Autor przedstawia analizę wyników uzyskanych dla kinazy PIM1 w kompleksie z trzema strukturalnie odmiennymi inhibitorami. Tą część rozprawy uważam za najbardziej wartościową, nie tylko ze względu na samą pracochłonność wykonanych eksperymentów (sama krystalizacja białek nosi przecież znamiona sztuki), ale na uzyskane wyniki, które mają duży potencjał aplikacyjny, poszerzają Naszą wiedzę i zrozumienie subtelnych interakcji białko-ligand oraz przybliżają do opracowania nowych terapeutyków. Sam rozdział (4.3) opracowany został ciekawie pod względem edytorskim - jednolita kolorystyka zastosowana w przedstawieniu struktur pozwala na ich porównanie między sobą. Doktorant przeprowadził analizę natury oddziaływań kinazy PIM1 z inhibitorami w uzyskanych strukturach krystalicznych. Szczególnie interesujące jest porównanie uzyskanych wyników do dostępnych danych krystalograficznych uzyskanych dla kompleksów kinazy PIM1 z inhibitorami o zbliżonej strukturze. Pozwala to na głębsze zrozumienie wymagań jakie powinny spełniać nowe inhibitory kinazy PIM1. Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na drobną pomyłkę – analizowany inhibitor kinazy PIM1 (7LI, 4dtk.pdb; strona 96) nie zawiera w swej strukturze grupy propylowej tylko *O*-izopropylową. Dodatkowo proszę o wyjaśnienie, czy w warunkach prowadzonych eksperymentów reszta Lys67 kinazy PIM1 ulega protonacji (Rysunek 35B i 38B), czy nie (Rysunek 32B)?

Pracę kończą dwa rozdziały poświęcone krótkiemu podsumowaniu uzyskanych wyników (2 strony) i dyskusji (11 stron). Poza wspomnianymi wcześniej uwagami dotyczącymi języka, nie mam do tej części żadnych uwag. Autor poprawnie analizuje uzyskane wyniki i odnosi je do danych literaturowych, co wskazuje na dobrą orientację w tematyce przedmiotu. Pozwolę sobie jednak na prośbę o wyjaśnienie, jak postęp w dziedzinie opieki paliatywnej pozwala częściowo na wcześniejsze wykrycie chorób o podłożu nowotworowym (strona 117)?



Politechnika Wrocławska

Wydział Chemiczny

Chciałbym jednocześnie podkreślić, iż powyższe uwagi mają jedynie charakter polemiczny, a występujące w pracy błędy czy niedociągnięcia w żaden sposób nie wpływają na moją wysoką ocenę jej wartości naukowej. Pan Karol Żrubek jest współautorem sześciu publikacji naukowych z tzw. *listy filadelfijskiej* (Journal of Biological Chemistry, 2023; ACS Medicinal Chemistry Letters, 2021; Archives of Biochemistry and Biophysics, 2019; Scientific Reports 2017×2; Journal of Colloid Interface Science, 2016) oraz współautorem pięciu doniesień konferencyjnych o zasięgu krajowym i zagranicznym. Na uwagę zasługuje także fakt udziału Autora w sześciu projektach naukowych oraz uzyskanie stypendium im. Jana Zurzyckiego w ramach dotacji KNOW (rok akademicki 2014/2015 oraz 2016/2017).

Podsumowując, pragnę z pełnym przekonaniem stwierdzić, iż przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr. Karola Żrubka spełnia zarówno zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim, jak i ustawowe kryteria określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455). Jednocześnie wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr. Karola Żrubka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne..



dr hab. inż. Marcin Sieńczyk, prof. uczelni