

**RECENZJA**  
**rozprawy doktorskiej mgr Karola Żrubka**

**pt. „Charakterystyka strukturalna kinaz białkowych istotnych w procesach nowotworzenia w kompleksach z niskocząsteczkowymi inhibitorami”**

wykonanej na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Grzegorza Dubina z Małopolskiego Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Celowanie to umiejętność precyzyjnego kierowania, lub skoncentrowania się na określonym celu lub obiekcie w celu osiągnięcia zamierzonego rezultatu. Może odnosić się do dosłownego celowania w rzutach, strzelaniu, lub wykorzystywania celownika w celu trafienia w biomolekułę. Doktorant skupił się w swojej pracy doktorskiej na „celowaniu” do kinaz białkowych a „nabojami”, jakie zastosował były niskocząsteczkowe związki organiczne. Tego typu podejście jest obecnie często stosowane w leczeniu wielu chorób. Istotną cechą tego typu terapii jest ich zdolność do precyzyjnego „celowania” i niszczenia czynników chorobotwórczych, takich jak białka aktywowane patogenami czy mutacje genów, które są odpowiedzialne za rozwój chorób. Działają one na zasadzie przeciwdziałania wyłącznie w danej jednostce chorobowej, bez uszkodzenia zdrowych komórek i tkanek, co stanowi ogromną przewagę w porównaniu z konwencjonalnymi metodami leczenia, takimi jak chemioterapia czy radioterapia. Pierwszym lekiem w terapii celowanej był Imatinib. Jego odkrycie miało miejsce w latach 90. XX wieku i zapoczątkowało erę terapii celowanych molekularnie w onkologii. Lek ten działa poprzez hamowanie działania konkretnego białka - kinazy tyrozynowej BCR-ABL, które jest przyczyną białaczki szpikowej. To była pierwsza terapia, w której skierowano leczenie na konkretne molekularne zmiany w organizmie pacjentów, a nie tylko na objawy choroby. Dzięki temu osiągnięto znaczący sukces w leczeniu białaczki, co wcześniej było trudne i miało niewielkie szanse na wyleczenie. Dzisiaj wiadomo, że lek ten celuje także w inne kinazy tj. CSF1R, ABL, c-KIT, FLT3 oraz PDGFR- $\beta$ . W nurt tych badań wpisuje się praca doktorska magistra Karola Żrubka, który postanowił przebadać dwie nowe grupy kinaz oraz ich inhibitory. Aby selektywnie wycelować w określony typ kinazy, niezbędny jest doskonały

„celownik” czyli struktura przestrzenna białka, oczywiście „nabój” czyli inhibitor, jak i doskonały „strzelec molekularny”, czyli Doktorant.

Rozprawa doktorska magistra Karola Żrubka została wykonana pod opieką prof. dr hab. Grzegorza Dubina. Praca posiada układ typowy dla prac eksperymentalnych z zakresu nauk ścisłych i przyrodniczych. Układ pracy jest logiczny i czytelny, co ułatwia nawigację w treści. Całość rozprawy obejmuje 142 strony maszynopisu i podzielona jest na sześć głównych rozdziałów (tj. wstęp teoretyczny, materiały i metody, wyniki, podsumowanie, dyskusja, oraz spis bibliograficzny). W pracy umieszczono kilka tabel, kolorowych rysunków struktur oraz schematów, które znacznie ułatwiły zrozumienie przedstawionych wyników. Spis piśmiennictwa obejmuje aż 241 pozycji (25 stron!), z których większość dotyczy odniesień znajdujących się we wstępie teoretycznym. Świadczy to o dobrym przygotowaniu Doktoranta do realizacji podjętego tematu. Rozprawa doktorska napisana jest w języku polskim, w sposób poprawny i przystępny. Doktorant popełnił kilkanaście błędów edytorskich, polegających głównie na umieszczeniu nieprawidłowej litery na końcu słów. Jednak zupełnie nie przeszkodziło mi to w poprawnym zrozumieniu tekstu. Szczególną uwagę zwracają podziękowania, skierowane do współpracowników i rodziny. Ich treść wskazuje, że Doktorant wykonywał pracę w sprzyjającej atmosferze zarówno w aspekcie rozwoju naukowego, jak i kontaktów międzyludzkich.

W rozdziale pierwszym zatytułowanym „Wstęp teoretyczny” Kandydat wprowadził czytelnika w tematykę kinaz białkowych, ich klasyfikacji, budowy strukturalnej oraz mechanizmu działania. Jest to doskonały materiał, oparty o bogate dane bibliograficzne i mógłby stanowić rozdział w polskojęzycznej książce dotyczącej enzymów. Szczególną uwagę poświęcił opisowi rodzinie kinaz PIM i ARK do których należą główne obiekty badawcze Doktoranta, czyli kinaza PIM1 i MELK. W opisie struktury kinazy PIM1 (str. 18, wers 11 od dołu i dalej) nie jest jasny dla mnie opis sieci wiązań wodorowych (lub ich brak) jaki występuje w tej kinazie. Proszę Doktoranta o pokazanie tych oddziaływań (lub ich brak) na schemacie, podczas obrony pracy doktorskiej. Następnie mgr Żrubka przedstawił najnowsze informacje na temat terapii związanych z celowaniem w kinazy jako skutecznych terapii przeciwnowotworowych. Ponieważ kinazy w genomie człowieka stanowią ok. 2% genów to dlatego są one doskonałym celem molekularnym. Wiele skutecznych leków przeciwnowotworowych nakierowanych jest właśnie na kinazy. Białka te są również obiektem szczególnego zainteresowania firm farmaceutycznych. Nie dziwi więc fakt, że Doktorant również zainteresował się tą tematyką. W tym miejscu proszę Doktoranta o informacje na temat nowoczesnych metod, stosowanych przez firmy farmaceutyczne, do poszukiwania nowych kinaz lub nowych inhibitorów (zakładając brak ograniczeń finansowych i aparaturowych). Czy narzędzia te mogłyby pomóc w terapii spersonalizowanej? Drugą część „Wstępu teoretycznego” stanowi charakterystyka małocząsteczkowych inhibitorów białkowych. Bardzo ciekawy w mojej opinii jest rozdział poświęcony klasyfikacji inhibitorów kinaz białkowych.

Motywacją dla Doktoranta do realizacji pracy doktorskiej był fakt, że z wcześniej prowadzonych z jego udziałem prac badawczych wynikało, iż reszta Cys89 w kinazie MELK posiada istotny wpływ na powinowactwo do ATP. Dlatego Doktorant postanowił zmutować tę resztę aminokwasową na Ala, Lys lub Arg oraz zbadać powinowactwo tych mutein do ATP lub do dorsomorfiny, czyli znanego inhibitora kinazy MELK. O ile uzasadnienie dla mutacji Cys na Ala znalazłam w pracy, to nie doszukałam się uzasadnienia dotyczącego zamiany Cys na Lys lub Arg. Proszę więc Doktoranta o uzasadnienie swojego wyboru. Natomiast motywacją do badań strukturalnych kinazy PIM1 oraz jej kompleksów inhibitorami był fakt braku takich struktur oraz chęć zrozumienia, na poziomie strukturalnym, silnych właściwości inhibicyjnych wybranych przez Doktoranta związków niskocząsteczkowych. Doskonale rozumiałam motywację Doktoranta do realizacji opisanych powyżej badań, jednak nie znalazłam w pracy sformułowanego celu pracy doktorskiej. Wzmianki o celach pracy doktorskiej znajdują się w streszczeniu pracy, jednak w mojej opinii mowa tam raczej o celach molekularnych, a nie o celach pracy doktorskiej. Proszę więc Doktoranta o przedstawienie celu pracy doktorskiej.

Następny rozdział dysertacji, zatytułowany „Materiały i metody”, został przez Doktoranta podzielony na dwanaście części, w których opisał wszystkie zastosowane przez siebie materiały, metody i procedury badawcze. Na początku opisał sposób produkcji i oczyszczania białek PIM1 oraz MELK i jej mutein. Następnie mgr Żrubek opisał procedurę oznaczania aktywności enzymatycznej kinaz z grupy MELK. Druga część tego rozdziału poświęcona jest pracom krystalizacyjnym, jakie prowadził Doktorant dla kinazy PIM1. Należały do nich, w dużym uproszczeniu: (i) wstępne testy krystalizacyjne, (ii) optymalizacja warunków krystalizacji, (iii) opis inhibitorów użytych do krystalizacji kompleksów, (iv) sposób nasączania kryształów PIM1 niskocząsteczkowymi inhibitorami, (v) pomiary dyfrakcji rentgenowskiej oraz (vi) określanie i udokładnianie struktury. W mojej opinii Doktorant zastosował prawidłowe metody do znalezienia odpowiedzi na postawione sobie zadania. Wszystkie czynności zostały dokładnie opisane i na pewno będą przydatne podczas przygotowania manuskryptu publikacji.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym „Wyniki” Doktorant przedstawił rezultaty swoich badań dla kinazy MELK i jej mutein. Z sukcesem udało się Doktorantowi otrzymać i oczyścić zaprojektowane muteiny oraz przeprowadzić dla nich testy powinowactwa. Wyniki tych badań potwierdziły kluczowy udział reszty Cys89 w powinowactwie enzymu do ATP oraz do dorsomorfiny, poprzez istotny udział tej reszty w tworzeniu wiązania wodorowego pomiędzy kinazą a inhibitorem. Okazało się, że mutacja Cys89 na Lys lub Arg powoduje prawie trzystukrotny spadek powinowactwa tych białek do dorsomorfiny. W rozdziale zatytułowanym „Dyskusje” Doktorant wyjaśnia, dlaczego reszty Lys i Arg tak bardzo wpływają na aktywność kinazy, podczas gdy mutacja Cys89 na Ala nie ma tak wielkiego wpływu. Doktorant tłumaczy tę zależność długością łańcucha bocznego zmutowanego aminokwasu. Czy istnieje możliwość, że oprócz długości

łańcucha bocznego wpływ na powinowactwo ma również ładunek (lub jego brak), znajdujący się w łańcuchu bocznym Lys i Arg? Rozumiem, że wyjaśnienia te byłyby w pełni możliwe, gdyby dostępne były struktury przestrzenne tych mutein. Czy w związku z tym podjęto próby krystalizacji zmutowanych wariantów kinazy MELK?

Druga część rozdziału „Wyniki” dotyczy badań strukturalnych kinazy PIM1 i jej kompleksów z inhibitorami o następujących nazwach: AZD1208, Związek 29 oraz SLVI420. Do badań Doktorant wybrał niskocząsteczkowe inhibitory o różnym mechanizmie działania i które posiadają wyjątkowo wysoką aktywność inhibicyjną wobec kinazy PIM1. Z sukcesem udało się Doktorantowi uzyskać i oczyścić białko PIM1, a następnie je wykrystalizować. Krysztaly białka PIM1 posłużyły w kolejnym kroku do nasączenia wymienionymi powyżej inhibitorami. Również z sukcesem Doktorant uzyskał krysztaly i struktury kompleksów PIM1-inhibitor o wysokiej rozdzielczości. Nie znalazłam jednak w pracy informacji na temat depozycji uzyskanych struktur w bazie PDB. Dla wszystkich uzyskanych kompleksów Doktorant przeprowadził bardzo dokładną analizę strukturalną. Tę część pracy doktorskiej, włącznie z przeprowadzonymi dyskusjami, oceniam bardzo wysoko, gdyż po pierwsze Doktorant w sposób wyczerpujący wyjaśnił model wiązania ligandów w kieszeni ATP kinazy PIM1, posiłkując się doskonale przygotowanymi rysunkami i schematami. Po drugie, Kandydat przeanalizował ułożenie przestrzenne badanych inhibitorów w porównaniu do innych już znanych struktur. Wyniki tych badań mogą być niezwykle pomocne podczas projektowania nowych inhibitorów o jeszcze lepszych parametrach. Pytanie jakie nasunęło mi się podczas lektury tej części pracy doktorskiej dotyczy rozpuszczalności badanych inhibitorów. Do badań krystalizacyjnych związki te zostały rozpuszczone w DMSO, a następnie tak przygotowane i rozcieńczone roztwory posłużyły do nasączenia krysztalów kinazy PIM1. W jaki sposób te hydrofobowe cząsteczki są dostarczane do organizmu w badaniach *in vivo* (klinicznych)? Czy podczas projektowania nowych inhibitorów kinaz bierze się również pod uwagę rozpuszczalność potencjalnego leku w wodzie?

Lektura kolejnego rozdziału pt. „Dyskusje” wskazuje na bardzo dużą dojrzałość naukową magistra Karola Żrubka. W rozdziale tym przedstawił wyniki swoich badań w odniesieniu do danych literaturowych. Szczególnie podoba mi się analiza zależności struktura-aktywność dla inhibitorów małowcząsteczkowych, która umożliwiła Doktorantowi na określenie wpływu określonych modyfikacji chemicznych na aktywność inhibicyjną. Wyniki te mogą stanowić cenne wskazówki do dalszych badań realizowanych w zespole prof. dr hab. Grzegorza Dubina. Na podkreślenie zasługuje również znajomość przez Doktoranta ograniczeń związanych z projektowaniem nowych inhibitorów kinaz oraz nowych wyzwań, jakie stoją przed „strzelcami molekularnymi” celującymi w kinazy. Z uwagi na to, iż zakończenie pracy doktorskiej jest nieco filozoficzne to, również pozwolę sobie na komentarz w podobnym stylu. „Celowanie” może odnosić się nie tylko do „celów molekularnych” ale również do bardziej abstrakcyjnych aspektów

życia, takich jak określenie celów i dążenie do nich. Uważam, że w tym zakresie pan Karol Żrubek okazał się „strzelcem wyborowym”. Na początku określił swój cel i rozłożył go na kroki. Następnie stworzył plan działania i skutecznie przeprowadził eksperymenty. Był zdeterminowany i wytrwały, co doprowadziło go do uzyskania ciekawych wyników badań. Pielęgnował motywację, co zakończyło się napisaniem rozprawy doktorskiej i wykazał się cierpliwością w oczekiwaniu na recenzje.

Do najważniejszych osiągnięć pracy, stanowiących jednocześnie element nowości naukowej, zaliczam **pełną charakterystykę funkcjonalności nowych wariantów kinazy MELK ze zmutowaną resztą Cys68** oraz **pełną charakterystykę strukturalną kompleksów kinazy PIM1 z nowymi inhibitorami**. Reasumując, uważam, że cele pracy doktorskiej zostały w pełni zrealizowane.

Uważam, że tematyka recenzowanej pracy doktorskiej jest bardzo interesująca i niezwykle potrzebna w świetle pogarszających się statystyk zachorowalności na nowotwory oraz braku skutecznych leków. Część doświadczalna pracy doktorskiej została dobrze zaplanowana a wyniki doskonale przedyskutowane i zinterpretowane. Rozprawa doktorska magistra Karola Żrubka zawiera bogaty, solidny i wartościowy materiał doświadczalny. Praca doktorska zawiera ważne wnioski dotyczące struktury kinaz białkowych i ich interakcji z inhibitorami. Autor wskazuje także na potencjalne perspektywy dalszych badań, co jest istotne w kontekście przyszłych kierunków rozwoju terapii przeciwnowotworowych. Biorąc pod uwagę powyższe fakty, stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z wymaganiami artykuł 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). W tym odniesieniu wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie magistra Karola Żrubka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Ponadto, mając na względzie wkład pracy Doktoranta w uzyskanie nowych w skali światowej wyników badań, dotyczących otrzymania i pełnej charakterystyki kompleksów kinazy PIM1 z nowymi inhibitorami, zwracam się do Wysokiej Rady z wnioskiem o wyróżnienie tej rozprawy.