



Wrocław, 24.11.2023

Recenzja pracy doktorskiej mgr Józefiny Bogusz-Krzywińskiej pt. „Analiza strukturalna kompleksów kinaz z inhibitorami małocząsteczkowymi”

Uwagi ogólne

Pani mgr Józefina Bogusz-Krzywińska wykonała pracę doktorską na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii oraz w Małopolskim Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod opieką pana profesora dr hab. Grzegorza Dubina. Recenzowana praca wpisuje się w prowadzone w grupie profesora Dubina badania z zakresu krystalografii białek, w szczególności charakterystyki strukturalnej kompleksów typu enzym-inhibitor. Doktorantkę zainteresowały kinazy białkowe, szczególnie te, o istotnej roli w procesie nowotworzenia. Enzymy te stały się jednym z głównych celów terapii przeciwnowotworowych, a projektowanie ich efektywnych inhibitorów mających potencjalne zastosowanie kliniczne celem licznych projektów badawczych. Poznanie oddziaływań kinaz białkowych ze związkami hamującymi ich aktywność jest istotnym krokiem na drodze optymalizacji parametrów tych związków i opracowania skuteczniejszych terapii. Dostępne dane literaturowe jasno wskazują, że obecna wiedza na temat oddziaływań kinaz z substancjami hamującymi ich działanie jest ograniczona do badań inhibicji w roztworze, z pominięciem badań strukturalnych. W związku z tym podczas realizacji projektu pracy doktorskiej, Doktorantka podjęła się otrzymania wybranych przedstawicieli kinaz białkowych (PIM1, PIM2, MELK i heksokinaza HK3), ich krystalizacji z niektórymi inhibitorami, rozwiązania struktur i ich analizy.

Rezultaty badań Doktorantki pozwoliły na opublikowanie dwóch artykułów naukowych. W jednym z nich Doktorantka jest pierwszą autorką. Warto podkreślić, że obie prace ukazały się w dobrych czasopismach o międzynarodowym zasięgu, to jest w *Scientific Reports* wydawnictwa Nature oraz *Archives of Biochemistry and Biophysics* wydawnictwa Elsevier. Obie prace dotyczą zagadnień i badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej.

Ocena formalna pracy

Z formalnego punktu widzenia oceniana praca doktorska na formę klasycznej rozprawy z podziałem na kilka części, w których to kolejno przedstawione zostały: skróty stosowane w pracy, streszczenie w języku polskim i angielskim, wprowadzenie literaturowe i cel pracy, opis używanych materiałów i stosowanych metod, uzyskane wyniki i ich dyskusja, podsumowanie oraz bibliografia. Prace badawcze były wykonane w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, brak jednak informacji jaki to projekt i kto jest jego kierownikiem (domyślam się, że Promotor). Praca doktorska została napisana w języku polskim i została zilustrowana 44 rysunkami przedstawiającymi struktury lub modele wiązań inhibitorów z białkami. Zawiera także 11 tabel.

W rozpoczynającym rozprawę wprowadzeniu Autorka jasno formułuje cele pracy oraz uzasadnia wybór tematu badań. W części doświadczalnej przedstawia opis wszystkich badań oraz analiz strukturalnych włączając również wyniki uzyskane przez pracowników firmy Selvita. W ramach pracy doktorskiej Doktorantka postawiła sobie za cel nadrzędny charakterystykę strukturalną kompleksów kinaz o istotnej roli w procesie nowotworzenia z niskocząsteczkowymi inhibitorami. Aby osiągnąć zamierzony cel sformowała szczegółowe cele badawcze:

- Po pierwsze to nadprodukcja kinazy PIM1, PIM2, MELK oraz HK3 w systemie ekspresyjnym *E. coli* a następnie oczyszczenie tychże białek do wysokiej czystości i homogenności,
- po drugie krystalizacja lub próba krystalizacji uzyskanych białek z niskocząsteczkowymi inhibitorami,
- po trzecie pomiar rozpraszania promieni rentgenowskich, rozwiązanie struktur krystalicznych uzyskanych kompleksów wraz z zaproponowaniem poprawy specyficzności zastosowanych inhibitorów.

Wprowadzenie jest dość obszerne i liczy 41 stron. Jest ono bardzo dobrze przygotowane i zawiera opis dostępnych informacji naukowych związanych z tematyką doktoratu. Doktorantka systematycznie przedstawia materiał potrzebny do uzasadnienia wyboru tematu badań oraz omawia te zagadnienia, które bezpośrednio wiążą się z przeprowadzonymi przez nią badaniami. Kolejne rozdziały wstępu poświęcone zostały występowaniu i funkcji kinaz, ze szczególnym naciskiem na te białka, które uczestniczą w procesie nowotworzenia oraz typom inhibitorów kinaz białkowych. Następnie Autorka przedstawiła szczegółowy opis poświęcony białkom, które stały się celem naukowym pracy, to jest kolejno kinazom PIM, MELK oraz heksokinazie HK3 skupiając się na regulacji ekspresji genów, fizjologicznej roli, a także roli w nowotworzeniu oraz opracowanym inhibitorom w/w kinaz. Doktorantka zaprezentowała i opisała sposoby wiązań inhibitorów w kompleksach, których struktury zostały już poznane i opisane. Cały rozdział, choć nieco za długi, przygotowany jest starannie i stanowi dobre wprowadzenie do kolejnych rozdziałów poświęconych omówieniu celu pracy oraz części doświadczalnej. Następnie Doktorantka zwięźle opisuje cel główny oraz cele szczegółowe pracy i przechodzi do omówienia stosowanych materiałów i metod badawczych. Wśród metod znalazły się techniki biologii molekularnej, nadprodukcja białek w systemie bakteryjnym (*E. coli*), oczyszczanie białek, testy aktywności, modyfikacja białek, krystalizacja z inhibitorami i rozwiązywanie oraz ilustracja struktur kompleksów. Rozdział ten jest treściwy, choć miejscami brakuje pewnych ważnych i przydatnych informacji takich jak pochodzenie wektorów czy samego DNA kodującego kinazy, producentów urządzeń czy firm dostarczających materiały, np. oligonukleotydy itp. Brak jest też wskazania jakie pH mają niektóre bufony, których skład podaje Doktorantka w Tabeli 4. Myślę, że cenne byłoby umieszczenie podstawowych informacji o produkcji białek, ich oczyszczaniu i krystalizacji. Nie każdy z czytelników jest zaznajomiony z typem kolumn, sposobem rozdziału, nadprodukcją czy wreszcie krystalizacją białek. Różnice choćby w sposobach krystalizacji i informacja dlaczego ta akurat metoda została użyta w pracy przydałyby się w szczególności. Cały rozdział posiada błędy interpunkcyjne czy gramatyczne, które utrudniają odbiór informacji, np. pominięcie spacji pomiędzy wartościami a jednostkami (ten błąd pojawia się zresztą w całej rozprawie), spacji i kursywy w nazwach łacińskich, czy niekonsekwencja w użyciu jednostek i skrótów, np. ul, μ l i μ L, „x” zamiast „×” czy

„” itp. Mimo tych błędów, rozdział zawiera najistotniejsze informacje na temat tego, w jaki sposób zostały przeprowadzone badania i analiza uzyskanych wyników.

Rezultaty badań Doktorantka przedstawiła na 25 stronach Rozdziału 4 z podziałem na cztery podrozdziały poświęcone kolejno opisywanym białkom tj. PIM1, PIM2, MELK czy HK3. W sekcjach tych zostały opisane działania Autorki w nadprodukcji białek z odpowiednią wydajnością, krystalizacji i charakterystyce strukturalnej kompleksów z inhibitorami. Umieszczanie podsumowania zaraz po wynikach (Rozdział 5) jest bardzo dobrym pomysłem, gdyż pozwala czytelnikowi podsumować starania Autorki i zweryfikować uzyskane cele. Stanowi on bardzo dobre przejście do kolejnego Rozdziału 6 czyli dyskusji. Jest on poświęcony dyskusji wyników prezentowanych w pracy doktorskiej na tle dostępnych danych literaturowych poświęconych badaniom oddziaływań kinaz PIM, MELK i heksokinazy HK3 z różnymi inhibitorami oraz analizie dostępnych struktur kompleksów z udziałem tych lub sekwencyjnie/strukturalnie podobnych kinaz. Autorka zawarła tu również perspektywy dalszych badań w kontekście uzyskanych przez siebie wyników. Rozdział jest przygotowany bardzo rzetelnie, co świadczy o sporej wiedzy Autorki oraz dojrzałości naukowej. Informacje na temat odnośników literaturowych zamykają rozprawę doktorską.

Ocena merytoryczna pracy

Pierwsza część badań dotyczy otrzymania kinazy PIM1 w systemie ekspresyjnym *E. coli*. Doktorantka rozpoczęła pracę od produkcji tego białka z użyciem wektora pET20b+-pim1 (nieznanego pochodzenia), jednakże z powodu niskiej wydajności produkcji (poniżej 0,4 mg/litr hodowli) przeklonowała wstawkę kodującą PIM1 do wektora pET-Duet1-pim1, co zakończyło się wzrostem wydajności do 4 mg/litr hodowli. Brak jest jednak wyjaśnienia różnic pomiędzy użytymi konstrukcjami. Otrzymane białko poddano optymalizacji krystalizacji a następnie uzyskano właściwe kryształy z inhibitorami CX-4945 i Ro-3306 w 1.2 M winianie potasowo-sodowym (0.1 M Tris-HCl, pH 8), które poddano analizie dyfrakcyjnej. Otrzymane wyniki pozwoliły stwierdzić, że struktura kinazy PIM1, podobnie jak innych kinaz jest dwupłatowa. Na podstawie mapy gęstości Doktorantka wnioskuje, że otrzymane białko jest ufosforylowane w pozycji Ser261 i być może posiada utlenioną

resztę Cys161. O ile utlenienie białka jest prawdopodobne podczas krystalizacji, o tyle jego fosforylacja już nie. Pojawienie się ufosforylowanej reszty nazywane jest przez Autorkę artefaktem ekspresji bakteryjnej. Dlaczego w badaniach (nie tylko tych) nie została użyta spektrometria mas, która byłaby metodą samą w sobie dla potwierdzenia tożsamości białek ale także ich modyfikacji? Uzyskane struktury kompleksów zostały bardzo dobrze przeanalizowane pod względem oddziaływań białko-inhibitor i porównane do struktur podobnych kinaz wykrystalizowanych z tymi samymi lub innymi inhibitorami. Uzupełnieniem badań strukturalnych było wyznaczenie wartości IC_{50} w teście ADP-GloTM. Choć Doktorantka porównuje wartości IC_{50} (podane bez błędów eksperymentalnych) to nie analizuje reprezentowanego przez tą wartość powinowactwa w kontekście oddziaływań obserwowanych w strukturze kompleksów. Co oznacza znak i wartość uzyskanych współczynników Hilla?

Rozszerzeniem pierwszej części badań była produkcja kinazy PIM2 celem jej dalszej krystalizacji. I w tym wypadku Autorka nie uzyskała białka za pierwszym razem. Wspomina, że przy klonowaniu wstawki PIM2 przeprowadzono analizę bioinformatyczną, co zaskutkowało uzyskaniem skróconej wersji białka (reszty 31-311), której produkcja okazała się znacznie wydajniejsza w porównaniu do pierwotnego wektora ekspresyjnego. Mimo podjętych prób krystalizacji, nie uzyskała jednak kryształów białka.

W kolejnym kroku Doktorantka podjęła się otrzymania kinazy MELK, której produkcja, jak mi nie wiadomo, była zadawalającej wydajności (brak informacji) i pozwoliła na przeprowadzenie w dalszym kroku optymalizacji krystalizacji. Autorka nie podaje uzasadnienia wyboru takiego, a nie innego wektora ekspresyjnego. Krystalizacja kinazy zakończyła się powodzeniem, a uzyskane kryształy nasączone roztworem dorsomorfiny poddano analizie dyfrakcyjnej, co w konsekwencji pozwoliło na uzyskanie struktury o rozdzielczości 2,24 Å. Podobnie jak w przypadku dwóch pierwszych struktur z PIM1, Doktorantka przeprowadziła skrupulatną analizę wiązania inhibitora do białka oraz porównała model wiązania dorsomorfiny do modelu wiązania AMP-PNP uzyskanego w wyniku badań innych autorów.

W ostatnim etapie badań, Doktorantka podjęła się produkcja kinazy HK3, która, jak sądzę, w pierwotnych zamierzeniach miała służyć do uzyskania struktur kompleksów

z małowcząsteczkowymi inhibitorami, choć formalnie nie był to cel pracy. Mimo, że białko pozyskano z wysoką wydajnością (10 mg/litr hodowli) to próby krystalizacji okazały się bezskuteczne. Autorka, nie poddając się, przeprowadziła metylację reszt lizyn w białku. Niestety i w tym wypadku nie uzyskała oczekiwanych kryształów zaniechując dalszych prac.

Podsumowanie

Podsumowując stwierdzam, że cel ogólny pracy został zrealizowany przez Doktorantkę, a mianowicie dokonała analizy strukturalnej kompleksów kinaz z inhibitorami małowcząsteczkowymi. Mimo pierwotnych zamierzeń nie udało się wykrystalizować wszystkich kompleksów. Doktorantka krok po kroku opisała zarówno sukcesy jak i porażki swoich działań. Rezultaty badań Doktorantki wnoszą znaczącą wiedzę na temat mechanizmu oddziaływań kinaz białkowych z inhibitorami. Do najważniejszych osiągnięć przedstawionej pracy doktorskiej należy:

- Otrzymanie białka PIM1 w systemie bakteryjnym, oczyszczenie go do wysokiej czystości a następnie uzyskanie kryształów PIM1 z inhibitorami CX-4945, Ro-3306, CX-6258.
- Rozwiązanie struktur otrzymanych kompleksów, a także analiza porównawcza z dostępnymi strukturami kinaz oraz zaproponowanie modyfikacji chemicznych inhibitorów prowadzących do poprawy specyficzności oddziaływań z kinazą PIM1.
- Otrzymanie, mimo początkowych problemów, kinazy PIM2 oraz oczyszczenie jej do homogenności.
- Nadprodukcja kinazy MELK, oczyszczenie jej do wysokiej czystości, a następnie uzyskanie kryształów z dorsomorfina.
- Rozwiązanie struktury krystalicznej kompleksu MELK-dorsomorfina oraz analiza porównawcza modelu wiązania inhibitora.
- Otrzymanie, mimo początkowych problemów, kinazy HK3 oraz oczyszczenie jej do homogenności.

Drobne potknięcia, jak na przykład niefortunne sformułowania czy też drobne błędy gramatyczne, literaturowe czy stylistyczne nie umniejszają mojej bardzo dobrej oceny przedstawionych osiągnięć Pani mgr Józefiny Bogusz-Krzywińskiej. Mam również prośbę wynikającą z czystej ciekawości, by podczas prezentacji wyników lub późniejszej dyskusji

odpowiedziała na pytanie dlaczego nasączała kryształy kinaz a nie prowadziła krystalizacji z roztworów kompleksów białko-inhibitor? Czy takie podejście dawałoby z założenia mniejsze szanse na uzyskanie kryształów?

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska została przygotowana w sposób staranny od strony merytorycznej i edytorskiej. Zawiera pełną dokumentację przeprowadzonych badań, ciekawą i rzetelną dyskusję uzyskanych wyników, poprawnie sformułowane wnioski. Wszystkie tabele i rysunki zostały wykonane z dużą starannością. Postawione cele pracy zostały zrealizowane, a otrzymane przez Autorkę wyniki badań poszerzają wiedzę z zakresu inhibicji kinaz oraz sposobu ich oddziaływań z małowcząsteczkowymi inhibitorami. Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Józefiny Bogusz-Krzywińskiej w pełni spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim zwarte w artykule 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 późn. zmianami). W związku z tym, z pełnym przekonaniem stawiam wniosek do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Józefiny Bogusz-Krzywińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku

Artur Krężel

