



prof. dr hab. Marcin Drąg
Katedra Chemii Biologicznej i Bioobrazowania
Politechnika Wroclawska

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Józefiny Bogusz-Krzywińskiej

z Zakładu Mikrobiologii
Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
oraz
Grupy Badawczej Krystalografii Białek
Małopolskiego Centrum Biotechnologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego

pt. „Analiza strukturalna kompleksów kinaz z inhibitorami małowcząsteczkowymi”

Kinazy jako grupa enzymów o bardzo dużym znaczeniu w tworzeniu nowych terapii medycznych, a w szczególności terapii przeciwnowotworowych, stanowią obecnie jeden z głównych kierunków badawczych w wielu laboratoriach akademickich, jak również w firmach biotechnologicznych czy farmaceutycznych. Wiele z tych badań jest zorientowanych na zrozumienie i udoskonalenie nowych struktur wiodących, co ma przełożyć się na nowe typy inhibitorów, a ostatecznie nowe typy leków. Przedstawiona do oceny praca doktorska wykonana przez mgr Józefinę Bogusz-Krzywińską doskonale wpisuje się w ten nurt badawczy.

Praca została wykonana pod opieką prof. dr hab. Grzegorza Dubina z Zakładu Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii oraz Grupy Badawczej Krystalografii Białek Małopolskiego Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, który specjalizuje się w tego typu badaniach.

Głównym celem pracy Doktorantki była charakterystyka strukturalna kompleksów kinaz o istotnej roli w procesie nowotworzenia z inhibitorami. Uszczegóławiając, Doktorantka w swoich badaniach postanowiła skupić się na otrzymaniu oraz rozwiązaniu struktur krystalicznych czterech kinaz – PIM1, PIM2, MELK oraz HK3. Taki wybór tematyki

badawczej w aspekcie medycznego znaczenia tych enzymów uważam za jak najbardziej trafny i uzasadniony.

Analiza bazy Pubmed wskazuje, iż jego dorobek badawczy mgr Józefiny Bogusz-Krzywińskiej stanowią dwie prace w bardzo dobrych recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym (*Arch. Biochem. Biophys.* - 2017 oraz *Scientific Reports* - 2019). W jednej z nich (*Scientific Reports*) Doktorantka jest pierwszym autorem, co szczególnie podkreśla jej wkład w prowadzone badania. Należy także podkreślić, iż obydwie prace dotyczą badań nad kinazami będącymi tematem pracy doktorskiej. Tym samym, powyższy dorobek naukowy oceniam wysoko.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska liczy 129 stron i ma klasyczny układ. W pierwszej części będącej wstępem teoretycznym Doktorantka przedstawia założenia, które doprowadziły do postawienia hipotezy badawczej i określenia celu pracy. Mgr Bogusz-Krzywińska dokładnie opisuje znaczenie kinaz w funkcjonowaniu organizmu żywego, a także ich dysfunkcje prowadzące do chorób, a zwłaszcza nowotworzenia. W poszczególnych rozdziałach przedstawia wszystkie trzy grupy badanych kinaz (PIM, MELK, heksokinazy) w historycznym aspekcie opublikowanych już badań. Analiza literatury źródłowej pokazuje, iż Doktorantka bardzo dobrze zna tematykę pracy, cytuje oryginalne teksty źródłowe, a niewiele prac przeglądowych. Całkowita liczba cytowań literatury w pracy jest bardzo wysoka i wynosi 191. Wszystkie rysunki zostały wykonane z najwyższą starannością i są w pełni informatywne.

Następnie, na jednej stronie mgr Józefina Bogusz-Krzywińska przedstawiła cele swojej pracy mające udowodnić postawioną hipotezę badawczą.

Kolejny rozdział jest poświęcony użytym materiałom oraz stosowanym metodom eksperymentalnym. Wszystkie opisy są jasne i klarowne, a ich szczegółowość z pewnością pozwoliłaby na ich powtórzenie przez niezależnego badacza.

W kolejnym rozdziale (Wyniki) mgr Józefina Bogusz-Krzywińska opisuje wyniki przeprowadzonych badań, a także w sposób dojrzały dyskutuje je w aspekcie opublikowanych danych literaturowych. Uzyskane wyniki są na wysokim poziomie merytorycznym i o dużej wartości naukowej. Szeroki wachlarz użytych metod eksperymentalnych wskazuje na dobry warsztat badawczy Doktorantki, a także na interdyscyplinarny charakter pracy. Co więcej, otrzymane wyniki otwierają nowe perspektywy badawcze.

Moje pytanie dotyczy tutaj analizy kinazy PIM1, a w szczególności dokowanie komputerowe. Doktorantka na stronie 84 twierdzi, iż „Dane z modelowania nie pokrywają się jednak z modelem uzyskanym metodą krystalografii rentgenowskiej (przedstawiony na

Rysunku 11A)”. Czy znane są powody tych różnic? Poproszę o szerszą dyskusję w tym temacie.

Kolejne moje pytanie dotyczy aktywności otrzymanych enzymów. Czy doktorantka miareczkowała otrzymane kinazy pod względem ich aktywności, a uściślając – jaki był procent aktywnego enzymu w całkowitej ilości otrzymanego białka? W pracy można znaleźć tylko opisy, iż potwierdzono aktywność danego białka.

W rozdziale Podsumowanie Doktorantka na jednej stronie opisuje zrealizowane cele badawcze oraz wyniki. Kolejny rozdział to Dyskusja, w którym mgr Józefina Bogusz-Krzywińska w dojrzały sposób dyskutuje uzyskane wyniki oraz prowadzi analizę porównawczą.

W tym rozdziale moje pytanie dotyczy inhibitorów dualnych. Doktorantka określa takie związki jako te, które mają zdolność do inhibicji dwóch kinaz. Powstaje tutaj pytanie, czy przetestowano wszystkie znane kinazy w kierunku takiej inhibicji, czy po prostu tylko te które były testowane w prowadzonych badaniach i z tego faktu wynika to określenie. Takie stwierdzenie znajduje się na przykład na stronie 108 – „Wyniki badań przedklinicznych wskazują, że EC-70124 jest kolejnym dualnym inhibitorem, który mógłby być wykorzystywany w terapii AML.”

Reasumując, za najważniejsze odkrycia naukowe pracy doktorskiej mgr Józefiny Bogusz-Krzywińskiej uważam:

1. Otrzymanie homogennej kinazy PIM1, a następnie krystalizacja tego białka z inhibitorami małowcząsteczkowymi – CX-4945, Ro-3306, CX-6258, przeprowadzenie analiz porównawczych oraz analiza strukturalna otrzymanych wyników w celu optymalizacji specyficzności zbadanych inhibitorów.
2. Otrzymanie homogennej kinazy PIM2 w postaci białka o pełnej, jak i skróconej sekwencji aminokwasowej.
3. Otrzymanie homogennej kinazy MELK, a następnie krystalizacja białka z inhibitorem małowcząsteczkowym – dorsomorfina, rozwiązanie struktury krystalicznej i przeprowadzenie analizy porównawczej.
4. Otrzymanie homogennej kinazy HK3.

Podsumowując wartość merytoryczną przedstawionej do oceny pracy doktorskiej mgr Józefiny Bogusz-Krzywińskiej, z pewnością można stwierdzić, iż wiele z otrzymanych wyników ma oryginalny charakter oraz znamiona odkrycia naukowego i może otworzyć nowe

kierunki badawcze w przyszłości.

Pod względem edytorskim i graficznym, praca doktorska mgr Józefiny Bogusz-Krzywińskiej została przygotowana w staranny sposób. Zdarzają się błędy interpunkcyjne czy edytorskie, niemniej ich ilość jest nieduża i nie ma wpływu na ogólną, wysoką ocenę pracy. Na szczególną uwagę zasługuje wysoki poziom przygotowania oraz przedstawienia wszystkich rycin i rysunków w ocenianej pracy. Jedyna moja drobna uwaga dotyczy skalowania rycin i rysunków do lewej strony. Uważam, iż lepszy wizualnie efekt uzyskano by przy ich wyśrodkowaniu.

Podsumowując, przedstawiona rozprawa doktorska mgr Józefiny Bogusz-Krzywińskiej z Zakładu Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii oraz Grupy Badawczej Krystalografii Białek Małopolskiego Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod tytułem „Analiza strukturalna kompleksów kinaz z inhibitorami małocząsteczkowymi” ma oryginalny oraz nowatorski charakter, a zawarte w niej wyniki badań mają zdecydowanie cechy nowości naukowej. Doktorantka w bardzo trafny sposób wybrała metody badawcze do swoich badań. Zamieszczone tutaj uwagi i zastrzeżenia nie mają wpływu na moją wysoką ocenę pracy. Po całkowitej ocenie przedstawionej pracy z całą pewnością stwierdzam, iż spełnia ona wszystkie zwyczajowe i ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim.

Wnoszę więc do wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne na Uniwersytecie Jagiellońskim o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku

prof. dr hab. Marcin Drąg

