



Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk



HR EXCELLENCE IN RESEARCH
Kraków, 9 grudnia 2022 roku

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Wróbel
zatytułowanej**

***„Badania strukturalne oddziaływania wybranych związków
trójcyklicznych z nowymi wariantami β -laktoglobuliny posiadającymi
modyfikacje w rejonie kieszeni wiążącej”***

Praca doktorska Pani mgr Pauliny Wróbel została przygotowana pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Krzysztofa Lewińskiego oraz Pani dr Joanny Loch w Zespole Biokrytalografii wchodzącym w skład Zakładu Krystalochemii i Krystalofizyki na Wydziale Chemii UJ w Krakowie.

We współczesnej medycynie coraz częściej i z coraz większym powodzeniem stosowane są białka w roli terapeutyków. Sztandarowym przykładem są tutaj przeciwciała monoklonalne stosowane w onkologii, których wprowadzenie do praktyki klinicznej bardzo poprawiło rokowania pacjentów z niektórymi typami nowotworów. Oprócz przeciwciał i niektórych enzymów, bardzo duży potencjał do zastosowań medycznych mają niewielkie białka globularne posiadające zdolność do selektywnego wiązania w swoim wnętrzu mniejszych cząsteczek. Będą one mogły znaleźć zastosowanie na przykład jako selektywne transportery leków lub jako cząsteczki wyłapujące i neutralizujące związki, których stężenie w płynach ustrojowych należy obniżyć, np. toksyn. Tematyka przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej p. mgr Pauliny Wróbel doskonale wpisuje się w ten obszar badawczy bazujący na poszukiwaniu modyfikowanych wariantów β -laktoglobuliny (BLG) o powinowactwie do biologicznie aktywnych ligandów. Jest to część i kontynuacja badań nad tym białkiem konsekwentnie realizowanych od około 2012 roku przez grupę badawczą skupioną wokół dr Joanny Loch i prof. Krzysztofa Lewińskiego.

Celem tej pracy było zaprojektowanie i otrzymanie nowych wariantów BLG, które nie będą wiązały naturalnych ligandów tego białka, czyli kwasów tłuszczowych, ale w zamian będą zdolne do wiązania cząsteczek leków trójpierścieniowych. Dla czterech takich wariantów białka oraz ośmiu leków oraz dwóch kwasów tłuszczowych Doktorantka przeprowadziła szeroko zakrojone badania strukturalne metodami biokrytalografii rentgenowskiej; stałe dysocjacji kompleksów białko-ligand wyznaczyła z widm dichroizmu kołowego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma układ klasyczny, otwiera ją lista zastosowanych skrótów oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. W rozdziale pierwszym, zatytułowanym „Wstęp”, Doktorantka nakreśliła tło swoich badań omawiając właściwości i strukturę BLG, znane jej kompleksy z ligandami

ul. Niezapominajek 8, 30-239 Kraków, Polska
tel. +48 12 639 51 01, +48 12 425 19 23
fax +48 12 425 19 23

Nr konta: Bank Gospodarstwa Krajowego
PL 36 1130 1150 0012 1186 5820 0004
NIP: 6750001805, REGON: P-000326351



oraz potencjał lipokalin, rodziny białek do których należy BLG, do zastosowań w medycynie. Nieco zaskakujący jest tutaj fakt, iż już w podrozdziale 1.8 Doktorantka przedstawia wybrane do swoich badań warianty BLG oraz ich ligandy, podczas gdy cele pracy są nakreślone w rozdziale drugim. Przegląd literatury oraz bazy struktur PDB przedstawiony przez p. mgr Paulinę Wróbel jednoznacznie wskazują, że warianty BLG mają szansę wiązać cząsteczki leków trójpierścieniowych, a uzyskane wyniki będą bardzo wartościowe, również w kontekście szerszej wiedzy o oddziaływaniach tych leków z białkami. Podjęcie tego tematu badawczego było więc w pełni uzasadnione i celowe.

Rozdział trzeci rozprawy, zatytułowany „Materiały i metody”, który mieści się na czterech stronach maszynopisu, zawiera zwięzłe opisy zastosowanych procedur badawczych. Pomimo tego, że opisy te są raczej oszczędne w słowa, są wystarczająco szczegółowe, by osoba posiadająca doświadczenie w tego typu badaniach była w stanie je powtórzyć.

Kolejny rozdział nosi tytuł „Wyniki” i przedstawia on w większości starannie opracowane i opatrzone odpowiednim komentarzem dane doświadczalne. Bardzo pomocne w analizie otrzymanych przez Doktorantkę wyników jest ich zestawienie w tabelach, które pozwala na ich szybką analizę i porównanie. Metodycznie i klarownie przedstawione są wyniki pomiarów CD, pomiarów dyfraktometrycznych, udokładniania struktur oraz same struktury form apo i kompleksów z ligandami dla czterech nowych wariantów BLG. Nieco słabszą stroną jest bardzo skrótowe potraktowanie wyników dotyczących otrzymywania preparatów białkowych. Mianowicie, podrozdział 4.2, dotyczący ekspresji i oczyszczania nowych wariantów BLG jest bardzo skromny, gdyż składa się na niego jedynie jeden ośmiolinijkowy paragraf oraz dwa rysunki. Nie dowiemy się z niego jakie były poziomy ekspresji poszczególnych badanych wariantów BLG ani jaka była wydajność [mg/L medium hodowlanego] dla finalnie oczyszczonego białka.

Rozdział piąty rozprawy, zatytułowany „Dyskusja wyników”, przedstawia wyczerpującą dyskusję wyników własnych Doktorantki z odniesieniem do danych z literatury dla BLG i jej wariantów, oddziaływania BLG i innych białek z lekami trójpierścieniowymi. W rozdziale tym Doktorantka zestawiała wyniki otrzymane dla poszczególnych wariantów BLG i ligandów i podjęła się próby ich generalizacji.

Rozdział szósty, o tytule „Wnioski”, prezentuje najważniejsze wnioski dotyczące wpływu mutacji na stabilność termiczną wariantów BLG, selektywność oraz siłę wiązania liganda trójpierścieniowego sformułowane w oparciu o wyniki przeprowadzonych badań.

Rozprawę zamyka statystyka wykonanych badań (tutaj tytuł „Podsumowanie” jest nieco mylący) i bibliografia obejmująca 223 pozycje. Suplement do pracy zawiera dodatkowo cztery rysunki oraz trzy tabele.



Układ rozprawy jest logiczny i przejrzysty, napisana jest ona bardzo starannie i poprawnym językiem; bardzo nieliczne błędy edytorskie i stylistyczne są rzeczą naturalną w rozprawie o tej objętości. Prezentację i dyskusję wyników bardzo ułatwiają przejrzyste rysunki i wykresy.

Zakres wykonanych przez Doktorantkę prac badawczych jest imponujący, obejmuje on między innymi:

- otrzymanie metodami biologii molekularnej nowego wariantu BLG (FA71W),
- wykonanie ponad stu hodowli bakteryjnych w skali 1 L,
- wykonanie ponad 50 cykli oczyszczania białka,
- zbadanie stabilności termicznej 4 nowych wariantów BLG metodą nanoDSF,
- wykonanie 37 pomiarów CD,
- nastawienie prawie 1000 kropli krystalizacyjnych,
- zebranie danych dyfrakcyjnych dla 36 kryształów białkowych (55 pomiarów dyfraktometrycznych),
- wyznaczenie 17 struktur kompleksów nowych wariantów BLG z lekami oraz 22 struktur bez liganda.

W mojej ocenie do najważniejszych osiągnięć Doktorantki uzyskanych w trakcie realizacji badań składających się na recenzowaną rozprawę należą:

1. wyznaczenie struktur kompleksów nowych wariantów BLG z lekami trójpierścieniowymi, wraz z wyznaczeniem stałych dysocjacji dla tych kompleksów,
2. zbadanie wpływu mutacji na stabilności termiczną wariantów BLG.

Osiągnięcia te stanowią doskonałą bazę do dalszych poszukiwań wariantów BLG wykazujących się dużym powinowactwem do leków trójpierścieniowych.

Uzyskane i opracowane przez Doktorantkę wyniki stanowią świetny materiał publikacyjny, który zapewne zostanie niebawem tak wykorzystany. Z obowiązku recenzenta wymieniam jednak poniżej kilka punktów do dyskusji podczas obrony.



1. Jednym z wymienionych na str. 35 celów pracy było zaprojektowanie nowych wariantów BLG, jednakże ani w rozprawie ani w cytowanych pracach nie mogłem znaleźć informacji w jaki sposób dobierane były w pary lub trójki pojedyncze mutacje, dla których wcześniej potwierdzono właściwe fałdowanie białka.
2. Jeśli uwzględnimy 6 pozycji w obrębie kieszeni wiążącej BLG, dla których otrzymano właściwie sfałdowane białko w formie rozpuszczalnej (39, 56, 58, 92, 105 i 107) oraz 8 aminokwasów hydrofobowych (Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Trp, Tyr, Met), które potencjalnie mogłyby się w tych pozycjach pojawić w wyniku mutacji, to liczba teoretycznie możliwych wariantów wynosi $8^6 = 262144$. Jak skutecznie przeszukać tą „przestrzeń” w poszukiwaniu wariantów o jeszcze lepszych parametrach: stabilności białka i siły wiązania badanych ligandów?
3. Czy warunki pomiarów z których wyników wyznaczono stałe K_a dla leków/białek osocza, cytowane w Tabeli 9 (str. 75), były porównywalne z tymi zastosowanymi przez Doktorantkę dla tych samych leków/wariantów BLG?

Podsumowując moją ocenę rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Wróbel chciałbym podkreślić wysoki poziom merytoryczny przeprowadzonych badań. Jakość i ilość wyników, ich profesjonalna analiza z odniesieniem do danych literaturowych wskazują na duże kompetencje Doktorantki w zakresie biokrytalografii białek.

Biorąc pod uwagę powyższe, stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego potwierdzające wiedzę oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych przez Doktorantkę, zatem spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w Ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz.85 z późn. zm.). Wnoszę więc do Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr Pauliny Wróbel do dalszych etapów przewodu doktorskiego i do publicznej dyskusji nad rozprawą.

Prof. Tomasz Borowski