

Prof. dr hab. Wojciech Rypniewski
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
Zakład Struktury i Funkcji Biomolekuł
e-mail: wojtekr@ibch.poznan.pl
tel: 61-8528503
fax: 61-8520532

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Bartosza Sekuły
pt. „Badania strukturalne końskiej albuminy surowiczej (ESA)
w kompleksach z ligandami o znaczeniu terapeutycznym”**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem promotorskim dr hab. inż. Anny Bujacz z Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej. W rozprawie badane są oddziaływania końskiej albuminy z wybranymi lekami przeciwzapalnymi, antybiotykami i z kwasem 3,5-dijodosalicylowym, który jest substratem w produkcji weterynaryjnych leków przeciw pasożytniczych.

Albumina występuje w dużych ilościach w osoczu krwi ssaków, utrzymując właściwą równowagę osmotyczną między krwią a innymi tkankami i transportując różnorodne ligandy, m.in. kwasy tłuszczowe i hormony. Wiąże także leki, wpływając na biologiczną dostępność podanych farmaceutyków. Zatem jej zdolność do oddziaływania z ligandami ma znaczenie także w medycynie i weterynarii. Sekwencja aminokwasowa albuminy z konia wykazuje blisko 80% identyczności z albuminą człowieka. Jeżeli weźmiemy pod uwagę te różnice, można uznać albuminę końską za pożyteczny, wstępny model w badaniach medycznych, nie tylko weterynaryjnych.

Cele badań zostały zdefiniowane na początku rozprawy. Doktorant podjął się zbadania struktury kompleksów albuminy końskiej z lekami przeciwzapalnymi i antybiotykami, transportowanymi przez to białko w układzie krążenia. Aby to osiągnąć konieczne były: oczyszczenie białka, utworzenie kompleksów z ligandami, krystalizacja, pomiary dyfrakcyjne i procesowanie danych, rozwiązanie, udokładnienie i analiza strukturalna otrzymanych modeli. Uważam, że problem jaki doktorant podjął się rozwiązać jest ambitny, interesujący z poznawczego punktu widzenia i dotyczy ważnego obszaru badań. Zatem teza naukowa postawiona przez doktoranta jest wartościowym tematem rozprawy doktorskiej.

Układ i edycja rozprawy. Rozprawa liczy blisko 150 stron wraz z obszerną bibliografią i jest podzielona na rozdziały w sposób tradycyjny. Po przedstawieniu celu pracy następuje wstęp, metodyka badań, opis doświadczeń, wyniki wraz z dyskusją i podsumowanie. Rozprawa napisana jest poprawną polszczyzną w sposób przystępny, stylistycznie na dobrym poziomie. Jako nieistotne pomijam drobne błędy językowe. Tekst jest starannie ilustrowany. Podsumowując stwierdzam, że doktorant wykazuje umiejętność właściwego przedstawienia uzyskanych wyników. Dobrze oceniam styl i przejrzystość rozprawy oraz jej poziom edytorski.

Część literaturowa. Wstęp jest treściwym wprowadzeniem w tematykę rozprawy. Najpierw opisana jest albumina – jej funkcja i struktura, a w szczególności jej liczne miejsca wiązania ligandów. Następnie przedstawiony jest problem biodostępności leków, a w szczególności ich transportu i wchłaniania w organizmie. Rozdział kończy podsumowanie dotychczasowej wiedzy na temat leków, o których wiadomo, że są wiązane przez albuminę. Bibliografia liczy

ponad dwieście pozycji literaturowych i obejmuje prace zarówno badawcze jak i metodologiczne w zakresie stosownym do tematyki rozprawy. Po zapoznaniu się z częścią literaturową dobrze oceniam teoretyczną wiedzę doktoranta w zakresie dyscypliny naukowej, której dotyczy temat rozprawy.

Rozdział *Metodyka* opisuje ogólnie podstawy zastosowanych metod, jak krystalizacja, pomiary dyfrakcyjne i analiza obrazów dyfrakcyjnych, a także interpretacja danych strukturalnych i ocena jakości otrzymanego modelu. Oprócz krystalografii mamy tu krótki opis izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego. Doktorant w tym rozdziale demonstruje ogólne zrozumienie warsztatu, którym się posługuje. Rozdział *Część doświadczalna* opisuje już konkretne prace, jakie zostały wykonane. To znaczy: oczyszczanie komercyjnie dostępnej albuminy, aby otrzymać jednorodny, odtłuszczony preparat, tworzenie kompleksów białka z ligandami drogą współkrystalizacji bądź namaczania ligandem kryształów białka oraz pomiary dyfrakcyjne wraz z podsumowaniem 13 zbiorów danych i wynikających z nich udokładnionych modeli cząsteczkowych. Rozdział ten uzupełniony jest opisem pomiarów kalorymetrycznych w celu zmierzenia energii tworzenia badanych kompleksów. Obliczono stechiometrię wiązania, stałą asocjacji, entalpię i entropię. Stwierdzam, że opis metodologii jest dostatecznie dokładny, aby wyniki eksperymentalne doktoranta uznać za wiarygodne.

Wyniki połączone są z dyskusją. Zwykle jestem zwolennikiem rozdzielenia, w miarę możliwości, tych dwóch rzeczy. Jednak w tym przypadku nie widzę problemów z oddzieleniem wyników eksperymentalnych od ich interpretacji. Zatem akceptuję tę formę opisu. Mgr inż. Bartosz Sekuła otrzymał i poddał szczegółowej analizie dziewięć kompleksów albuminy surowiczej z ligandami: z czterema niesterydowymi lekami przeciwzapalnymi, z czterema antybiotykami i z kwasem 3,5-dijodosalicylowym, który jest substratem w produkcji niektórych leków.

Analiza struktur jest skomplikowana i trudno, żeby było inaczej. Albumina wiąże tak wiele różnych ligandów w swoich licznych miejscach wiązania, że trudno mówić o specyficzności. Doktorant jednak dobrze sobie radzi. Nie tylko opisuje, co widzi, ale porównuje różne struktury, nie tylko swoje – ale także struktury pokrewnych białek opisanych przez innych badaczy – i szuka wspólnych cech. Na przykład wszystkie badane leki przeciwzapalne posiadają grupę karboksylową, która wiąże się z białkiem podobnie, w jednej z jego kieszeni. W przypadku diklofenaku i naproksenu przeprowadza krystalograficzny eksperyment w celu zbadania konkurencyjności wiązania albuminy przez oba leki – najpierw przez współkrystalizację, a następnie przez zmianę roztworów celem wyparcia jednego związku przez drugi. Te doświadczenie doktorant uzupełnił miareczkowaniem kalorymetrycznym tworzenia kompleksów białka z lekami w roztworze. Udało mu się przypisać mierzone efekty termalne do większości zaobserwowanych miejsc wiązania ligandów i określić stałe asocjacji i parametry termodynamiczne. Jest to, moim zdaniem, bardzo udane doświadczenie, które pokazuje jak kalorymetria i krystalografia mogą się uzupełniać. Bez krystalografii nie można byłoby zinterpretować złożonych efektów termalnych i przyporządkować ich do konkretnych miejsc wiązania, a bez kalorymetrii nie można stwierdzić czy obserwowane oddziaływanie wynika ze znaczącego powinowactwa między cząsteczkami, czy jest efektem przedawkowania ligandu w roztworze krystalizacyjnym.

Na uwagę zasługuje także obserwacja map gęstości elektronowej wskazująca na hydrolizę związanych antybiotyków – ampicyliny i oksacyliny. Już wcześniej przypisywano albuminie słabe właściwości hydrolityczne, ale obserwacje doktoranta są tego bezpośrednim dowodem.

Ponadto doktorant tłumaczy to zjawisko wygiętą konformacją cząsteczki związanego antybiotyku i proponuje sąsiadującą cząsteczkę wody jako nukleof reakcji oraz mechanizm aktywacji tej cząsteczki wody przez pobliskie elementy białka.

Po bardzo wnikliwej analizie miejsc wiązania ligandów i porównaniu albuminy z surowicy konia z albuminami blisko spokrewnionych gatunków zwierząt doktorant dochodzi do wniosku, że „zdolność do wiązania poszczególnych substancji, a więc i cechy transportowe, są w pewnym stopniu cechą charakterystyczną dla danego gatunku”. Rzeczywiscie albuminy zdają się ewoluować nadzwyczaj szybko. Ja też zwróciłem uwagę, że zachowawczość poniżej 80% w sekwencji aminokwasowej dla tego białka, między blisko spokrewnionymi gatunkami ssaków, jest stosunkowo niska. Świadczy to albo o niskiej, albo o zmiennej presji ewolucyjnej.

Mam pytanie w związku z tym, że na rysunkach pokazujących oddziaływania wodorowe ligandów z białkiem niektóre odległości wydają się dość duże a kąty małe. Współrzędne atomowe większości prezentowanych struktur nie są jeszcze dostępne w domenie publicznej i miałem do dyspozycji jedynie dwuwymiarowe ilustracje. Dlatego proszę doktoranta o komentarz na temat kryteriów jakie zastosował w wyznaczaniu wiązań wodorowych, w szczególności w aspektach (1) odległości między donorem i akceptorem (2) kątem wyznaczonym przez atomy donora, wodoru i akceptora.

Część wyników badań wchodzących w skład niniejszej rozprawy została opublikowana w międzynarodowych czasopismach. Doktorant jest pierwszym autorem dwóch publikacji, które ukazały się w *International Journal of Biological Macromolecules* (Impact Factor 3,138) i w *Journal of Medicinal Chemistry* (IF 5,589). Jest też współautorem pracy w *Proteins* (IF 2,499). Ponadto doktorant jest współautorem czternastu modeli strukturalnych zdeponowanych w banku danych PDB, z których większość jest wynikiem pracy przedstawionej w niniejszej rozprawie.

Podsumowując, oceniam niniejszą rozprawę wysoko. Doktorant bardzo dobrze sprostał wyzwaniom. Mgr inż. Bartosz Sekuła dysponuje pogłębioną wiedzą w obszarze krystalografii. Rozwiązał postawiony problem samodzielnie i przy użyciu właściwej do danego zadania metody. Wykazał się dużą starannością i wnikliwością w dążeniu do naukowego celu. Rozprawa w pełni spełnia wymogi formalne stawiane w tej mierze pracom doktorskim, dlatego wnoszę do Rady Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie kandydata do dalszych etapów przewodu.

Z uwagi na sukces w publikowaniu wyników wnoszę o wyróżnienie tego doktoratu. Załączam osobne uzasadnienie.

Wojciech Rymusiński

Poznań, 24 sierpnia 2016 roku

Prof. dr hab. Wojciech Rypniewski
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
Zakład Struktury i Funkcji Biomolekuł
e-mail: wojtekr@ibch.poznan.pl
tel: 61-8528503
fax: 61-8520532

**Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Bartosza Sekuły
pt. „Badania strukturalne końskiej albuminy surowiczej (ESA)
w kompleksach z ligandami o znaczeniu terapeutycznym”**

Moja recenzja wyżej wymienionej rozprawy jest jednoznacznie pozytywna. Ponadto zwracam uwagę, że część wyników badań wchodzących w skład niniejszej rozprawy została opublikowana w międzynarodowych czasopismach naukowych. Doktorant jest pierwszym autorem dwóch publikacji, które ukazały się w *International Journal of Biological Macromolecules* (Impact Factor 3,138) i w *Journal of Medicinal Chemistry* (IF 5,589). Jest też współautorem pracy w *Proteins* (IF 2,499). Ponadto doktorant jest współautorem czternastu modeli strukturalnych zdeponowanych w banku danych PDB, z których większość jest wynikiem pracy przedstawionej w niniejszej rozprawie. Z uwagi na to wnoszę do Rady Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

Wojciech Rypniewski

Poznań, 24 sierpnia 2016 roku