



**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Pawła Strzelczyka  
"Badania strukturalne kompleksów awidyny z ligandami"**

Wydział Chemii

Rozprawa doktorska mgr Pawła Strzelczyka została zrealizowana Instytucie Biochemii Technicznej Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej pod kierunkiem prof. dr hab. Grzegorza Bujacza. Badania były częściowo finansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektów PRELUDIUM i ETIUDA oraz z Funduszu Młodych Liderów Nauki na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej.

Tematyka prac wykonanych w ramach przewodu doktorskiego jest częścią prowadzonych w grupie prof. Bujacza badań nad nowymi potencjalnymi lekami o działaniu przeciwnowotworowym tworzonymi na bazie biotyny. Pan Strzelczyk przeprowadził badania strukturalne oraz scharakteryzował metodami fizykochemicznymi sześć kompleksów awidyny z pochodnymi biotyny.

Rozprawa doktorska ma zasadniczo typowy układ oparty na czterech częściach zawierających wstęp, omówienie metod badawczych, przedstawienie uzyskanych wyników oraz ich dyskusję. Dodatkowo, rozprawa zawiera kopie pięciu publikacji, w których wykorzystane zostały wyniki uzyskane przez Doktoranta. Ze względu na udział w nich innych autorów nie traktuję tych publikacji jako części rozprawy podlegającej ocenie, natomiast ich obecność przyjmuję z zadowoleniem, gdyż pozwalają lepiej poznać kontekst w jakim prowadzone były badania przedstawione w rozprawie a także zawierają dodatkowe wyniki nie będące przedmiotem samej rozprawy.

ul. Ingardena 3  
PL 30-060 Kraków  
tel. +48(12) 633 63 77  
fax +48(12) 634 05 15  
sekretar@chemia.uj.edu.pl  
www.chemia.uj.edu.pl

Zasadniczym, przedstawionym na samym początku rozprawy, celem pracy było zbadanie wiązania pochodnych biotyny z awidyną i określenie ewentualnych zmian w strukturze białka wywołanych tym wiązaniem. Awidyna tworzy z biotyną kompleks uważany za jeden z najtrwalszych występujących w przyrodzie. Dlatego, poznanie oddziaływań między białkiem a ligandami było istotne gdyż może to zostać wykorzystane do zaprojektowania nowych pochodnych biotyny o niższym powinowactwie.

Wstęp teoretyczny skupia się na trzech zagadnieniach: awidynie i jej strukturze oraz własnościach, biotynie i roli, którą pełni w organizmie oraz na budowie i wykorzystaniu w analityce biomedycznej kompleksów awidyny z biotyną i jej pochodnymi. Ponadto, we wstępie znalazło się krótkie, zaledwie dwustronicowe, przedstawienie związków metalocenowych i możliwości ich użycia w leczeniu nowotworów z wykorzystaniem biotyny jako wektora kierującego. Szkoda, że ten rozdział nie został nieco bardziej rozbudowany, gdyż zastosowania te wydają się kluczowe dla uzasadnienia celowości realizacji badań przedstawionych w rozprawie.

Podstawową techniką eksperymentalną wykorzystywaną przez doktoranta była rentgenowska analiza strukturalna. Dlatego, kolejna część rozprawy poświęcona jest omówieniu metodyki tych badań ze szczególnym uwzględnieniem specyfiki badań struktury krystalicznej białek. Ze względu na ich złożoność przedstawienie w sposób wyczerpujący a jednocześnie zwięzły tych zagadnień jest zadaniem bardzo niewdzięcznym. Badania strukturalne obejmują szereg kolejnych etapów zarówno eksperymentalnych jak i obliczeniowych o całkowicie odmiennej metodologii i każdy z tych etapów wymaga odrębnego omówienia. Uważam, że pan Strzelczyk poradził sobie z tym problemem bardzo dobrze. Na dwudziestu stronach przedstawiony został zarówno ogólny tok analizy strukturalnej jak też wymienione zostały najistotniejsze najczęściej spotykane problemy i omówione metody ich rozwiązywania. Dobór treści umożliwia poznanie tych zagadnień przez osobę nie zajmującą się na co dzień krytalografią ale równocześnie opis procedur nie jest nadmiernie uproszczony.

Załączone do rozprawy publikacje wskazują, że badania prowadzone przez Doktoranta były częścią większego projektu realizowanego we współpracy z osobami z innych ośrodków naukowych. Dlatego należy podkreślić, że prezentacja wyników zawarta w rozprawie napisana została w pierwszej osobie, co jednoznacznie określa udział Doktoranta w całości badań.

Zasadniczym elementem badań przedstawionych w rozprawie było wyznaczenie struktury krystalicznej siedmiu kompleksów awidyny z ligandami. W czterech przypadkach ligandami były ferrocenowe i rutenocenowe pochodne biotyny, kolejnym ligandem był znacznik fluorescencyjny HABA a ostatnie dwa ligandy były pirenowymi pochodnymi biotyny i destiobiotyny, również o właściwościach fluorescencyjnych. Awidyna została zakupiona i doczyszczona przez doktoranta natomiast ligandy (za wyjątkiem HABA) zostały zsyntezowane i udostępnione przez dr hab. Damiana Płażuka z Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. Kryształy kompleksów awidyny z ligandami we wszystkich przypadkach zostały uzyskane przez Doktoranta metodą kokrysztalizacji. Pomiar dyfrakcyjny został wykonany z użyciem synchrotronowych źródeł promieniowania w Berlinie i Hamburgu. Struktury krystaliczne zostały wyznaczone i udokładnione przy użyciu bardzo podobnych protokołów postępowania a jakość uzyskanych struktur nie budzi zastrzeżeń. Oprócz badań strukturalnych Doktorant przeprowadził pomiary powinowactwa ligandów do awidyny przy użyciu metody miareczkowania kalorymetrycznego (ITC) oraz termoforezy mikroskalowej.

Uzyskane wyniki stały się podstawą do analizy oddziaływań białko-ligand, przedstawionej w rozdziale piątym rozprawy. Ponadto, Doktorant dokonał porównania cząsteczek awidyny pochodzącej z różnych struktur krystalicznych i określił charakter zmian zachodzących w białku w procesie przyłączenia liganda. Do najistotniejszych wyników uzyskanych i przedstawionych w rozprawie należą moim zdaniem:

- uzyskanie po raz pierwszy i zbadanie struktury kompleksów awidyny z metalocenowymi pochodnymi biotyny o potencjalnym znaczeniu w terapii nowotworów oraz pirenowymi pochodnymi biotyny
- stwierdzenie, że wprowadzone modyfikacje biotyny przyniosły pożądany efekt w postaci niższego powinowactwa awidyny do ligandów
- stwierdzenie wpływu ligandów na warunki krystalizacji i symetrię kryształów kompleksów oraz otrzymanie kryształów o symetrii nie obserwowanej wcześniej dla kompleksów awidyny
- stwierdzenie, że ugrupowania rutenocenowe i ferrocenowe mogą być związane w białku poprzez słabe wiązania wodorowe do elektronów  $\pi$  pierścieni cyklopentadienyłowych

- stwierdzenie, że awidyna wykazuje stereospecyficzność wiązania cząsteczki FcBiotOH
- stwierdzenie związku pomiędzy konformacją elastycznej pętli CD a wiązaniem ligandów o zróżnicowanej budowie
- rozstrzygnięcie, która forma tautomeryczna barwnika HABA jest związana przez awidynę
- określenie roli wiązań wodorowych w stabilizowaniu liganda w kieszeni wiążącej

Rozprawa została napisana dobrą polszczyzną i przygotowana bardzo starannie. Dotyczy to zarówno jej szaty graficznej jak też zawartości merytorycznej. Rysunki i tabele zostały przygotowane z dużą dbałością. Kolor jest używany nie tylko na rysunkach struktur, ale również do wyróżnienia na diagramach symboli niektórych atomów i orbitali oraz w treści rozprawy dla tytułów rozdziałów i symboli badanych związków. Zwraca też uwagę bibliografia zawierająca aż 200 pozycji literaturowych, z których każda zawiera pełny tytuł publikacji. Rozprawa zawiera też wykaz używanych skrótów, rysunków i tabel oraz przedstawienie dorobku naukowego Doktoranta. Wprawdzie znalazłem w kilku miejscach drobne błędy, tzw. literówki (na przykład „e” zamiast „ę”) jednak jest ich naprawdę niewiele. Jedyny istotniejszy błąd to stwierdzenie zamieszczone na str. 47 „... ilość atomów niewodorowych w strukturze nie przekracza 1000” gdzie należało użyć wyrażenia „liczba atomów”.

Za wyjątkiem kompleksu FcHomoBiot-en, struktury pozostałych związków zostały już opublikowane a co za tym idzie, przeszły przez sito weryfikacji ze strony recenzentów powołanych przez odpowiednie czasopisma. Ze swej strony nie dopatrzyłem się w rozprawie istotnych uchybień natomiast, nasunęło mi się kilka uwag i pytań:

- Czy tetramer awidyny jest obecny również w roztworze czy też jest tylko wynikiem specyficznego upakowania dimerów w kryształach? Na stronie 123 rozprawy Doktorant powołuje się na wyniki analizy przy użyciu serwera PISA, która „potwierdziła, że awidyna w roztworze występuje jako tetramer” jednak analiza wykonana była w oparciu o kontakty międzycząsteczkowe w kryształach, które wykazują znaczne dysproporcje zarówno pod względem powierzchni oddziaływania jak też liczby tworzonych wiązań wodorowych i mostków solnych. Czy są dostępne w literaturze wyniki badania masy cząsteczkowej awidyny w roztworze?

- Jakie są powody niepowodzenia w uzyskiwaniu kryształów kompleksów metodą nasączenia? Oprócz wspomnianego w rozprawie na str. 96 wpływu siarczanu amonu może to być spowodowane blokowaniem miejsca wiążącego przez ciasne upakowanie cząsteczek w kryształach lub przez elastyczną pętlę CD.
- Dwie struktury zostały rozwiązane z użyciem programu Phaser a pozostałe, programu Molrep. Czy były jakieś merytoryczne powody takiego wyboru programów, o których w rozprawie nie wspomniano czy też była to kwestia arbitralnego wyboru?
- Czy dla związku FeHexHexBiot były prowadzone badania powinowactwa metodą termoforezy tak jak dla pozostałych kompleksów?
- Czy krystalizacja kompleksu związku FcBiotOH była prowadzona z użyciem tylko jednego stereoizomeru (S lub R) czy też stosowana była mieszanina obu enancjomerów?
- W opisie oddziaływań z udziałem pirenowych pochodnych biotyny pojawiają się sformułowania „trzeci arkusz  $\beta$ ” oraz „ósmi arkusz  $\beta$ ” podczas gdy arkusz  $\beta$  jest tylko jeden a powyższe sformułowania odnoszą się oczywiście do trzeciej i ósmej nici tego arkusza.
- Na str. 121 doktorant pisze, że „w porównaniu do kompleksów z metalocenowymi pochodnymi biotyny (np. RuBiot) nie występują bezpośrednie oddziaływania reszt aminokwasowych białka z ugrupowaniem pirenowym” podczas gdy w strukturze PirBiot Ser73 znajduje się we wszystkich podjednostkach w odległości około 3.5 Å i poniżej od pirenu co wskazuje na wiązanie wodorowe do elektronów  $\pi$ , analogiczne do obserwowanego w strukturze RuBiot. Podobnie jest w strukturze PirDestioBiot, tyle że tam oddziaływania tworzone są dla podjednostki C przez Thr40 a dla podjednostki D przez Ser101.
- Czy różnice w oddziaływaniach metalocenu z białkiem w strukturach RuBiot i FcBiotOH nie są raczej wynikiem obecności dodatkowej grupy hydroksylowej w tej drugiej strukturze a nie zmiany metalu?
- Zabrakło mi w podsumowaniu wyników zestawienia pokazującego jak powinowactwo awidyny do ligandów spada wraz z wprowadzanymi modyfikacjami (co było jednym z celów pracy). Wprawdzie wszystkie te informacje są zawarte w rozprawie ale są

rozproszone pomiędzy kolejnymi rozdziałami a porównania nie ułatwia różna forma prezentowania wyników stosowana dla różnych grup pochodnych.

Podsumowując, stwierdzam że rozprawa prezentuje nowe, oryginalne i istotne wyniki badań stanowiące rozwiązanie problemu naukowego. Wysoki poziom naukowy badań jest dodatkowo potwierdzony przez opublikowanie ich wyników w postaci pięciu artykułów w bardzo dobrych czasopismach o zasięgu światowym. Udział mgr Pawła Strzelczyka w otrzymaniu wyników jest dobrze udokumentowany i świadczy o jego umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Wykazał on też dobre opanowanie literatury przedmiotu oraz biegłość w posługiwaniu się nowoczesnymi metodami krystalografii białek.

**W świetle powyższego, uważam, że rozprawa spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 w stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) i stawiam wniosek do Rady Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie pana mgr Pawła Strzelczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej**



prof. dr hab. Krzysztof Lewiński