



DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES

National Institutes of Health

Eunice Kennedy-Shriver National Institutes of Child Health and Human Development, Bethesda, MD

PAN - Instytut Immunologii	
Wpł. dnia	19-10-2018
L. dz.	477/2018

Bethesda, 05.10.2018

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Konrada Kowalskiego

“Nowe metody otrzymywania i właściwości biochemiczne związków boru z białkami”

Łagodna i selektywna modyfikacja reszt aminokwasowych białek jest ważna w badaniach struktury i funkcji tych cząsteczek. Dodatkowo, połączenie białkowych antygenów z małymi, często syntetycznymi podstawnikami, pozwala na tworzenie nowych struktur, jak na przykład szczepionek koniugatowych. Dobór warunków koniugacji jest niezwykle ważny aby ten proces był wydajny. W warunkach idealnych, ilość związanych cząsteczek powinna być kontrolowana i homogenna, a przyłączony ligand oraz modyfikowany nośnik powinny zachować swoje funkcje biologiczne. Produkty koniugacji powinny mieć cechy pozwalające na dokładne scharakteryzowanie, zarówno pod względem właściwości fizykochemicznych jak i miejsc połączeń, w celu zapewnienia powtarzalności eksperymentów. Szczególnym wyzwaniem jest koniugacja ligandów amfifilowych, o słabej rozpuszczalności w buforach i mających skłonność do agregacji. Do grupy tego typu badań można zaliczyć pracę doktorską mgr. Konrada Kowalskiego, której przedmiotem jest badanie właściwości koniugatów związków boru z białkami.

Klaster boru posiadają unikalne cechy i wzbudzają rosnące zainteresowanie w medycynie. Są stabilne, niskotoksyczne, a połączone z białkami nadają im nowe właściwości fizykochemiczne i biologiczne, jak na przykład przedłużenie czasu działania w organizmie. W związku z tym badania nad prowadzeniem kontrolowanych reakcji modyfikacji białek kilkoma różnymi klasterami boru, jak i dokładna charakterystyka otrzymanych produktów, jest niezwykle ważna i z tego powodu uważam tą pracę doktorską za interesującą i wartościową.

Przedstawiona do recenzji rozprawa liczy 119 stron i została podzielona na części: streszczenie, wykaz dorobku, wstęp, materiały, metody, wyniki oraz dyskusja, podsumowanie i bibliografia.

W rozdziale ‘Wstęp, cel i założenia pracy’ doktorant omawia zastosowanie związków boru w medycynie, charakterystykę klasterów boru i ich oddziaływanie z białkami oraz opisuje techniki

wykorzystywane do fizykochemicznych badań właściwości białek. Na początku autor podaje przykłady leku przeciwnowotworowego i przeciwgrzybiczego oraz objaśnia udział atomu boru w mechanizmie działania tych leków. Następnie doktorant przedstawia zastosowanie związków boru jako znaczników fluorescencyjnych w diagnostyce oraz w terapii borowo-neutronowej używanej do leczenia nowotworów. W kolejnym fragmencie doktorant w interesujący sposób opisuje budowę klasterów boru takich jak klaster dwudziestościenne, karborany, zawierające jeden lub więcej atomów węgla i metalokarborany, zawierające skoordynowany atom metalu oraz omawia ich zastosowanie jako farmakoforów i koniugatów makrocząsteczkowych. Ostatnia część poświęcona jest technikom badania fizykochemii białek, jak spektrometria masowa, dichroizm kołowy i dynamiczne rozpraszanie światła. Omówiony fragment pracy jest logiczny i uzasadnia podjęty plan badań własnych oraz dobór metod. Interesującym dodatkiem do wstępu byłoby omówienie możliwych schematów kowalencyjnego wiązania słabo rozpuszczalnych w środowisku wodnym klasterów boru do białek, a w dalszej części pracy, uzasadnienie wyboru adduktów oksoniowych, a nie innych pochodnych reaktywnych wobec grup funkcyjnych aminokwasów.

Cztery wybrane pochodne klasterów boru zostały elegancko przedstawione na rysunku w części 'Materiały', a analizy ich stabilności w roztworach wodnych i rozpuszczalnikach organicznych przeprowadzono poprawnie przy użyciu ESI-MS-TOF oraz ESI-MS/MS. Jedyna uwaga to brak wyjaśnienia dlaczego nie przeprowadzono wstępnej analizy związku BC-4, używanego w dalszych eksperymentach. Następnie autor opisał metody ich koniugacji z blokowanymi aminokwasami, lizozymem jaja kurzego i ludzką insuliną oraz techniki oczyszczania, analiz chemicznych i biologicznych otrzymanych koniugatów. Eksperymenty zostały zaplanowane poprawnie oraz przedstawione jasno i szczegółowo.

W rozdziale 'Wyniki oraz dyskusja' autor przedstawił szeroką reaktywność przykładowego klasteru boru, adduktu dioksanowego metalokarboranu (BC-3), z nukleofilowymi grupami funkcyjnymi aminokwasów, takimi jak grupy aminowe, guanidynowe, imidazolowe i tiolowe. Badania oparte były na szczegółowej interpretacji widm fragmentacyjnych ESI-MS-TOF. Wyniki zachęcały do prowadzenia dalszych eksperymentów z użyciem białek.

Reakcje lizozymu jaja kurzego z adduktami klasterów boru przeprowadzono dwoma sposobami: w środowisku wodno-organicznym oraz w fazie stałej w podwyższonej temperaturze. W roztworze uzyskano i oczyszczono koniugaty lizozymu postawione jedną cząsteczką metalokarboranów. Efektywność syntezy tych dwóch koniugatów wyniosła ok. 50 %. Klaster boru BC-1 nie wykazał reaktywności w tych warunkach, jakkolwiek nie jest tutaj jasne dlaczego nie analizowano dalej koniugatu karboranu BC-2. Prowadząc reakcje w fazie stałej uzyskano koniugaty wszystkich czterech klasterów z wyższą wydajnością;

efektywność reakcji z BC-4 wzrosła do ponad 70 %. Analizy widm HPLC-ESI-MS-TOF oraz widm dichroizmu kołowego jednopodstawionych koniugatów metalokarboranów wykazały zachowanie struktury pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowej lizozymu. Analizy z użyciem techniki dynamicznego rozpraszania światła zademonstrowały skłonność koniugatów do agregacji. Wszystkie koniugaty wykazały obniżoną aktywność biologiczną lizozymu. Autor właściwie wykonał badania nad syntezą i charakterystyką koniugatów z lizozymem, z użyciem licznych nowoczesnych technik i staranną interpretacją danych.

Kolejnym krokiem było dobranie optymalnych warunków reakcji klasterów boru z ludzką insuliną. Założeniem tej części pracy było zwiększenie powinowactwa insuliny do ludzkiej albuminy i wydłużenie czasu półtrwania tego hormonu w ustroju. W tym celu przeprowadzono szereg wstępnych reakcji. Do dalszych badań wyizolowano i oczyszczono jednopodstawione koniugaty adduktów dioksanowych dodekakarboranu i metalokarboranu. Kolejnym zadaniem było zlokalizowanie miejsca podstawienia łańcucha klasteru boru w obrębie cząsteczki insuliny. W tym celu autor trawił koniugaty enzymami proteolitycznymi i analizował otrzymane peptydy za pomocą technik LC-MS/MS i ESI-MS-TOF. W rezultacie zidentyfikował kilka różnych aminokwasów ulegających jednoczesnemu podstawieniu na łańcuchu B insuliny. Uzyskane produkty nie były zatem jednolite, ale z danych z piśmiennictwa wynika, że podstawione aminokwasy nie biorą udziału w wiązaniu insuliny do receptora, a co za tym idzie aktywność biologiczna insuliny potencjalnie nie powinna ulec obniżeniu, choć wymaga to dodatkowego eksperymentu w przyszłości. W ostatnim etapie pracy doktorant wykazał, w oparciu o techniki wygaszania fluorescencji, iż jednopodstawione koniugaty metalokarboronu z insuliną wykazują około 200 razy wyższą zdolność wiązania do ludzkiej albuminy niż komercyjnie dostępny długodziałający analog - detemir. Uzyskane w tej części wyniki są obiecujące i zachęcają do prowadzenia dalszych badań, zwłaszcza do uzyskania jednolitych koniugatów, podstawionych jednym klasterem metalokarboranu na zidentyfikowanym aminokwasie ludzkiej insuliny, w celu zapewnienia powtarzalności i harmonizacji badań biologicznych.

W podsumowaniu; przedstawiona praca doktorska obszernie opisuje badania w ważnej, z punktu widzenia praktycznego, dziedzinie wiedzy. Doktorant wykazał się znajomością metod syntezy koniugatów, ich oczyszczania i charakterystyki biologicznej i fizykochemicznej z użyciem najnowszych technik badawczych. Wyniki są jasno opisane i ładnie zilustrowane. Każda część pracy jest krótko podsumowana, co ułatwia czytelnikowi śledzenie prowadzonych eksperymentów i zrozumienie wyboru kolejnych kroków. Część uzyskanych wyników została opublikowana w trzech renomowanych angielskojęzycznych czasopismach.

Poza kilkoma uwagami wymienionymi powyżej, drobne błędy to:

- str. 3: spis treści ma nierówne akapity;
- str. 4: w spisie treści brakuje rozdziału 7.2.;
- str. 5: nie jest jasne, co autor rozumie pod nazwą białka bioaktywne;
- str. 6: zdolność wiązania konigatu z insuliną do HSA była 200-krotnie, a nie 20-krotnie wyższa;
- str. 49: tytuł rozdziału 6.12. należy poprawić;
- str. 88: w środowisku wodno-organicznym, w przypadku lizozymu klaster BC-1 nie wykazał rekatywności, a w przypadku insuliny, klaster BC-2, lecz autor nie skomentował tej różnicy lub jest to pomyłka w oznaczeniu;
- brakuje konsekwencji w używaniu skrótów BC-1 lub BC1 dla wszystkich czterech związków;
- opisy rysunków z widmami powinny wskazywać jaką technikę fragmentacji była użyta.

Moja ocena przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej jest wysoce pozytywna. Spełnia ona wymagania wynikające z ustawy o stopniach i tytule naukowym. Na tej podstawie mam zaszczyt i przyjemność zwrócenia się do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu o dopuszczenia mgr. Konrda Kowalskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, mając na uwadze wysoki poziom przedstawionej pracy i fakt opublikowania części wyników w renomowanych czasopismach, wnoszę o wyróżnienie tej rozprawy stosowną nagrodą.

Z wyrazami szacunku



Joanna Kübler-Kiełb

Joanna Kübler-Kiełb, PhD, DSs
Health Scientist Administrator
Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health & Human Development
Scientific Review Branch
6710 Rockledge Drive, Rm 2137B
Rockville, MD 20817