

Warszawa, 8.01.2021 r.

Prof. Dr hab n med Lucjan Wyrwicz
Klinika Onkologii i Radioterapii
Narodowy Instytut Onkologii im M Skłodowskiej-Curie
Ul. Wawelska 15, 02-034 Warszawa

**Recenzja rozprawy doktorskiej pana Mgr Tomasza Gradowskiego zatytułowanej
„Analiza bioinformatyczna pełnego zbioru ludzkich kinaz oraz kinaz organizmów związanych z
człowiekiem“**

Pomimo znacznych sukcesów w badaniach nad genomem w dalszym ciągu istnieje potrzeba dla charakteryzacji nowych szlaków sygnałowych, które mogą stanowić cel dla terapii celowanej. Dotychczas stosowane metody leczenia posiadają ograniczoną skuteczność, przy istotnych działaniach ubocznych. Leki ukierunkowane na hamowanie kinaz stanowią ważny element terapii wielu chorób, w tym onkologicznych, a kluczowym dla rozwoju nowych cząsteczek jest specyficzność inhibicji. Jednocześnie – kinazy ze względu na ewolucyjnie ukształtowaną budowę miejsca aktywnego są relatywnie „łatwymi“ celami terapeutycznymi i jak pokazały ostatnie lata – wiedza na temat biologii kinaz, czy historii naturalnej chorób powiązanych z dysregulacją aktywności kinaz pozwala na stworzenie coraz to skuteczniejszych terapii. Modelowa choroba w tym zakresie jaką jest rak płuca powstający na podłożu zaburzeń onkogennych kinaz EGFR czy ALK – rozwój nowoczesnych specyficznych inhibitorów tych kinaz powoduje, iż rokowanie w tej grupie chorób jest wyjątkowo korzystne, tj. parametry długości życia pacjenta z zaburzeniami kinazy ALK leczonego paliatywnie za pomocą odpowiednich inhibitorów kinaz są zbliżone do paramterów długości życia „nieselekcjonowanych“ pod względem molekularnym pacjentów z rakiem płuca, ale z tą różnicą, iż pacjentów wyselekcjonowanych pod względem stopnia zaawansowania, tak iż możliwe jest leczenie radykalne. Stąd mówimy, iż wiedza na temat kluczowych onkogenów i ich hamowania może pozwolić na dokonanie przemiany w kierunku onkologii jako nauki o przewlekłym leczeniu nowotworów. Tym samym znajomość „pełnego zbioru“ kinaz na czym skupia się przedmiotowa rozprawa doktorska wpisuje się w zapotrzebowania jakie onkologia stawia przed badaniami podstawowymi. Dodatkowo – praca zakładała analizę kinaz bakteryjnych *Legionella*, co można potraktować nie tylko jako dowód na

poprawność przyjętej metodyki, ale także jako przykładowe studium przypadku mające wskazać na użyteczność opracowanego sposobu postępowania w praktycznych badaniach naukowych.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska przygotowana przez pana mgr. Tomasza Gradowskiego stanowi kompleksowe studium problemu jakim jest charakteryzacja kinaz genomu człowieka oraz charakteryzacja pełnego zestawu kinaz bakteryjnych organizmów z wybranego rodzaju (*Legionella*).

Przedstawiona do recenzji rozprawa zawiera 153 strony, składa się z 6 rozdziałów opisujących wstęp, przeglądu literatury, celów pracy, materiał i metody, wyniki i dyskusję oraz wnioski oraz rozległy supplement. Całość uzupełniona jest spisem literatury. Autor w pracy cytuje łącznie 249 pozycji piśmiennictwa, w większości z ostatnich lat, a całość rozprawy została estetycznie złożona i wydana w formie książkowej. Wyniki pracy zostały częściowo opublikowane w recenzowanych czasopismach w trzech manuskryptach, z których doktorant jest pierwszym autorem jednego z nich.

Wstęp przedstawia powody dlaczego warto było zainteresować się tym tematem i ogólny stan wiedzy w przedmiocie projektu. **Omówiono powody wyboru tego rodzaju bakterii oraz nietypową konstrukcję pracy, jaką jest przeanalizowanie zestawu kinaz człowieka i rodzaju *Legionella*.** Czytając pracę po raz pierwszy, takie zestawienie wydawało mi się nie racjonalne, jednak po zagłębieniu się w dalsze rozdziały recenzent musi przyznać, iż inaczej opisałby wstęp łączony te dwie analizy (badam człowieka dla sprawdzenia przyjętej metodologii, ponieważ dla zestawu kinaz ludzkich mamy dane referencyjne; więc jeśli moja analiza odtworzy dane referencyjne to mogę założyć, iż przeprowadzenie podobnego sposobu prowadzenia analiz może dać także wyniki uprawdopodobnione do tego, że są prawdziwe). Jeśli taki był cel połączenia tych dwóch analiz to powinno to być odzwierciedlone zarówno w tytule (np. „metoda klasyfikacji pełnego zestawu kinaz kodowanych w wybranym kładzie filogenetycznym optymalizowana na przykładzie genomu człowieka i zastosowanie tej metody do pełnej klasyfikacji kinaz bakterii rodzaju *Legionella*“). W mojej ocenie powiązanie dwóch części niniejszej pracy daje wrażenie luźnego związku i recenzent chciałby dowiedzieć się czy dobrze rozumie powiązanie między dwiema analizami (zastrzeżenie nr 1).

W kolejnej części – przeglądzie literatury – odniesiono się szczegółowo na temat wiedzy biologicznej z zakresu przedmiotu rozprawy. Rozdział ten jest szczególnie wartościowy z powodu rozległości problematyki i w konieczności wprowadzenia szeregu terminów bioinformatycznych, dla których nie ma dobrze zdefiniowanych terminów w języku polskim.

Rozdział ten w niniejszej pracy jest rozbudowany, ale mając na względzie wielopłaszczyznowy charakter badań, zakres niniejszej części należy ocenić za odpowiedni.



Jednocześnie – niniejszy rozdział odpowiednio odzwierciedla ilość wiedzy w tym temacie i wskazuje na to, że założony cel badawczy nie jest banalny.

Cel pracy przedstawiono w zwartej formie. Poza ogólnym celem – badania szerokiego repertuaru kinaz – praca ma także konkretne cele szczegółowe – a są nimi: bioinformatyczne poszukiwanie nowych kinaz białkowych i pseudokinaz wśród białek bakterii z rodzaju *Legionella*, bioinformatyczne scharakteryzowanie tychże kinaz i pseudokinaz, klasyfikacja nowych i znanych kinaz *Legionella* oraz porównanie kinaz białkowych i ludzkich. Tak sformułowane cele są komplementarne i stanowią o potencjalnie wysokiej wartości niniejszej rozprawy.

W rozdziale poświęconym materiałom i metodom szczegółowo omówiono metodykę wykorzystaną w pracy, opisując narzędzia analityczne i używane zbiory wiedzy. Opisano algorytm przetwarzania danych dotyczących sekwencji białkowych, który jest jednak algorytmem relatywnie klasycznie stosowanym w tego typu projektach. W kolejnych podrozdziałach omówiono metody analizy sekwencji pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowych białek kodowanych w poszczególnych genomach. Oddzielne podrozdziały poświęcono analizom ko-lokalizacji genomowych – metodzie używanej w analizie funkcji genów bakteryjnych – oraz badaniom filogenetycznym. Całość rozdziału zakończona jest przedstawieniem protokołu analitycznego, który systematyzuje wcześniej opisane podejście i jest wielce pomocny dla recenzenta w odtworzeniu sposobu prowadzenia badań. W pracy brakuje rozróżnienia metod na te, które możliwe są do stosowania przy analizie genomów bakteryjnych i ludzkich. Przykładowo – w analizach filogenetycznych nie omówiono filogenezy struktur egzon-intron, która jest kluczowa w indentyfikacji pseudogenów, ale wyłącznie u Eukaryota. **Być może przydatne byłoby zestawienie tabelaryczne wskazujące, które z wymienionych metod były stosowane w analizie genomu człowieka, a które przy analizie *Legionella* (zastrzeżenie nr 2).**

W rozdziale poświęconym prezentacji wyników badań omówiono adekwatnie do kolejności wykonanych eksperymentów uzyskiwane wyniki. Typowo dla prac z zakresu bioinformatyki rozdział ten nazwano „Wyniki i dyskusja“, co choć dla innych dziedzin nauki mogłoby być uznane za błąd to w tej dziedzinie nie tylko jest standardowo stosowane, co także odpowiednio odzwierciedla sposób prowadzenia analiz. Należy tu nadmienić, iż większość wyników badań bioinformatycznych ma charakter uprawdopodobnienia wniosków i zwykle przedstawienie konkretnego wyniku wymaga przeprowadzenia natychmiastowej dyskusji wariantowej przedstawiającej uzyskane dane w kontekście wiedzy. **W ocenie recenzenta w rozdziale tym brakuje podkreślenia, czy zdarzały się takie sytuacje, w których przyjęty algorytm analizy wskazywał na obecność wybranej aktywności dla konkretnego białka (typu „aktywność kinazy białkowej“), a przegląd literaturowy wiedzy na**



temat konkretnego przedstawiciela tej rodziny nie potwierdzał przypuszczeń autora (zastrzeżenie nr 3).

W kolejnym rozdziale przedstawiono syntetycznie wnioski w formie jednego akapitu podsumowania obserwacji względem konkretnej rodziny białkowej. W opinii recenzenta rozdział ten jest odpowiednim podsumowaniem całości obserwacji i w znacznej części powinien być przeniesiony do streszczenia, które w ocenie recenzenta jest zbyt zwarte. Dodatkowo w końcowej części opracowania zawarto suplement, w którym zaprezentowano dane w formie 16 tabel, do których znajdziemy odnośniki w tekście rozprawy.

Praca całościowo jest metodycznie opracowana prawidłowo. Doktorant poprawnie używa terminów z zakresu biologii molekularnej oraz bioinformatyki. Drobne nieścisłości językowe nie wpływają na klarowność przekazu i recenzent chciałby podkreślić, iż przedstawiona do oceny praca jest pod tym względem względnie wyróżniająca się. Nie jest bez znaczenia fakt, iż dla wielu określeń wykorzystywanych w bioinformatyce brakuje polskich tłumaczeń, które oddawałyby w sposób zwarty całość znaczenia ich odpowiedników w języku angielskim. Pewnym rozwiązaniem jest z góry założenie, iż rozprawa jest przygotowywana w języku angielskim, wówczas „slang bioinformatyczny“ powszechnie używany w tej i podobnych pracach stawałby się mniej rażący (np.: str. 130 – „Analiza CD-search otoczeń genomicznych białek rodziny Lani_1194 i NoeA“). Dyskusyjną kwestią jest powód zawężenia się w analizach do rodzaju Legionella. Nie są to najbardziej istotne klinicznie patogeny bakteryjne. Dla recenzenta wybór ten jest jednak oczywisty – nie jest to rodzaj bakterii aż tak szeroko badany jak inne „pałki Gram-ujemne“, a z drugiej strony nie jest on nadmiernie odległy filogenetycznie od rodzajów bakterii dla których posiadamy dostateczną wiedzę ułatwiającą interpretację nowych postawionych przez doktoranta tez. Stąd, metodą złotego środka, wybrano pewnie Legionella. Należy jednak zauważyć, iż oczekiwaniem stawianym przed doktorantem jest stworzenie dzieła, które posiada wymiar nowatorski i nie należy negatywnie oceniać sprytu jaki przyświecał takiemu czy innemu wyborowi kierunku badań.

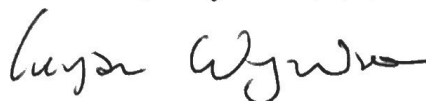
Analizując przedstawioną pracę należy się zastanowić, czy analizy spełniły założony cel. Nie ma wątpliwości, iż przeprowadzono analizę kompleksową, wytypowano szereg nowych rodzin i równolegle scharakteryzowano eksperymentalnie (poza głównym nurtem tej pracy) szereg obserwacji. Tak więc jest to praca kompletna w rozumieniu rozpraw naukowych z zakresu bioinformatyki, a w szczególności badania odległego podobieństwa rodzin białkowych, w której autor stawia tezy, uprawdopodobnia w sposób typowy dla metodologii bioinformatycznej oraz ostatecznie prowadzi to do weryfikacji wybranych nowych obserwacji.



W odpowiedzi na niniejszą recenzję chciałbym poprosić doktoranta o ustosunkowanie się do trzech zastrzeżeń jakie zaznaczono w treści recenzji. Choć, moje obserwacje nie dyskredytują niniejszego opracowania naukowego, to byłbym wielce zobowiązany mogąc zapoznać się z odpowiedzią na moje komentarze.

Podsumowując, przedstawiona do recenzji rozprawa stanowi dzieło naukowe spełniające kryteria stawiane przed rozprawami doktorskimi. Pomimo pomniejszych mankamentów pracy, niniejszą rozprawę należy ocenić dobrze. Praca z pewnością stanowi ważne opracowanie, które choć może nie prowadzi do przełomu w badaniach nad kinazami, ale prezentowane wnioski stanowią wartość dodaną do dziedziny. Mając na względzie powyższe - wnoszę o dopuszczenie doktoranta do dalszych etapów postępowania.

Warszawa, 08 stycznia 2021 r.



Prof. Lucjan Wyrwicz