

Prof. dr hab. Jacek Jemielity  
Laboratorium Chemii Biologicznej  
Centrum Nowych Technologii  
Uniwersytet Warszawski  
e-mail: [j.jemielity@cent.uw.edu.pl](mailto:j.jemielity@cent.uw.edu.pl)  
tel. 22 5543774

Warszawa 16.08.2023

**Ocena dorobku naukowego i rozprawy habilitacyjnej zatytułowanej "Naturalna, ukierunkowana i przypadkowa mutageneza jako narzędzie do badania zależności struktura-funkcja w cząsteczkach wybranych białek" Dr Joanny Loch.**

Dr Joanna Loch jest absolwentką Wydziału Chemii, Uniwersytetu Jagiellońskiego, gdzie uzyskała stopień magistra chemii na podstawie pracy magisterskiej pt.: „Wpływ mutacji na stabilność struktury białek z rodziny rybonukleaz” wykonanej pod kierunkiem prof. dr. hab. Krzysztofa Lewińskiego. W 2011 roku uzyskała stopień naukowy doktora nauk chemicznych w tej samej jednostce pod opieką tego samego opiekuna na podstawie rozprawy doktorskiej zatytułowanej „Badania strukturalne kompleksów  $\beta$ -laktoglobuliny ze związkami bioaktywnymi”.

Po doktoracie, w okresie 2011 - 2023 dr Joanna Loch była zatrudniona w Zakładzie Krystalochemii i Krystalofizyki Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego początkowo jako asystent, a od 2014 jako adiunkt. W roku 2018 dr Loch odbyła 3 miesięczny staż badawczy w University of Virginia w USA. Współpracę tę dr Loch zamierzała kontynuować o czym świadczy uzyskanie stypendium w programie im. Bekkera NAWA, 2020-2021, niestety wybuch pandemii pokrzyżował te plany. Warto zwrócić też uwagę na owocną współpracę krajową z Prof.

Jaskólskim z Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk (IChB PAN) w Poznaniu. Współpracy tej towarzyszyły cztery krótkoterminowe pobyty w IChB PAN (długość pojedynczych pobytów od 4 tygodni do 3 miesięcy). Dzięki odbytym stażom i pracom z nich wynikających widać jakościową zmianę w dorobku naukowym Kandydatki, co mam nadzieję zaprocentuje również na dalszych etapach kariery naukowej.

### **Ocena cyklu publikacji**

Do osiągnięcia naukowego zatytułowanego "Naturalna, ukierunkowana i przypadkowa mutageneza jako narzędzie do badania zależności struktura-funkcja w cząsteczkach wybranych białek" Kandydatka zakwalifikowała cykl jedenastu prac przedstawiających zastosowanie mutagenezy w badaniach strukturalnych białek. Wśród tych 11 prac wszystkie to oryginalne prace eksperymentalne, we wszystkich tych pracach Dr Loch jest pierwszą autorką (w pracy H7 pozycja ta jest współdzielona z innym autorem) dodatkowo w czterech jest ona autorką korespondencyjną lub współkorespondencyjną. Nie ma więc wątpliwości co do wysokiej samodzielności Kandydatki. Prace wchodzące w skład cyklu opublikowano w czasopiśmie o dość różnorodnej reputacji od znakomitych (Nature Comm.) do publikacji w czasopiśmie cieszącym się dość przeciętnym uznaniem środowiska (Acta Bioch. Pol., Molecular Biotechnology, Biopolymers). Sumaryczny IF prac zaliczonych do cyklu to 46.7, co daje 4,2 na pracę co jest wynikiem przyzwoitym.

Wspólnym mianownikiem w pracach zamieszczonych w cyklu jest wykorzystanie mutagenezy w badaniach strukturalnych i funkcjonalnych białek. Pierwsze prace cyklu poświęcone są badaniom laktoglobulin białek zawartych w mleku niektórych gatunków ssaków [H1, H2, H3, H6]. Habilitantka w szczególności poświęciła uwagę czterem z nich: izoformą B (BLG\_B) oraz izoformą A (BLG\_A) wołowej laktoglobuliny, izoformą A owczej laktoglobuliny (SLG\_A) oraz laktoglobuliną z mleka koziego (GLG). Jest to kontynuacja wcześniejszych badań Kandydatki, z których niektóre były dobrze cytowane. W pracach H1 i H2 Habilitantka wraz ze współpracownikami badali zależną od pH zmianę konformacyjną laktoglobuliny. Proces zwany przejściem Tanforda opisano w 1998 roku dla białka wołowego, autorzy postanowili zbadać czy przejście konformacyjne zachodzi również dla białka owczego (SLG\_A) oraz koziego (GLG). Habilitantka wykazała, że w cząsteczkach tych laktoglobulin również następują systematyczne zmiany konformacyjne w rejonie pętli EF typowe dla przejścia Tanforda. W kolejnych pracach [H3 i H6] badano białka SLG\_A oraz GLG które różnią

się między sobą tylko jedną resztą aminokwasową (N130K), i wykazują szereg podobnych właściwości. Jednak właściwości tych białek wykazują odmienne właściwości w stosunku od BLG\_B pod względem zdolności do tworzenia kompleksów z ligandami w fazie krystalicznej [H3, H6]. W pracy H3 przedstawiono strukturę kompleksu GLG z pramokainą (środek miejscowo znieczulający) zawierającą pierścień aromatyczny, która została związana we wnętrzu  $\beta$ -baryłki. Badania kontynuowano poszukując ligandów alifatycznych dla białka SLG\_A o ile udało się tworzenia takich kompleksów potwierdzić w roztworze to wykryć udaje się udaje się jedynie dla 1-dekanolu [H6]. Cała ta część pokazuje dobry warsztat Kandydatki, która sprawnie posługuje się technikami pozwalającymi na wyznaczenie struktury białek i ich kompleksów z ligandami, oraz badaniami funkcjonalnymi w roztworze. Konkluzja płynąca z tej części jest taka, że białka te prawdopodobnie pełnią podobną funkcję fizjologiczną związaną z dostarczaniem składników odżywczych młodym ssakom. Pewnie zróżnicowanie pomiędzy białkami z różnych organizmów dotyczące wiązania ligandów wynikające z naturalnych mutacji, może być powiązane ze zróżnicowaną fizjologią oraz tempem wzrostu ssaków z różnych gatunków oraz może stanowić ich przystosowanie ewolucyjne do warunków życia i środowiska. To ciekawa koncepcja jednak ciągle zbyt słabo udokumentowana eksperymentalnie.

Kolejna seria prac wchodzących w skład cyklu [H4, H5, H7, H8, H10] związana jest z wykorzystaniem ukierunkowanej mutagenyzy do modyfikacji kształtu miejsca wiążącego w  $\beta$ -baryłce laktoglobuliny wołowej, jak potencjalny sposób dostarczania wybranych leków lub selektywnego wiązania wybranych związków bioaktywnych. Ta część cyklu wydała mi się koncepcyjnie bardzo interesująca, choć oczywiście nie obyło się bez problemów związanych z produkcją zmutowanych białek, a następnie ich skutecznym fałdowaniem, a co za tym idzie i krystalizacją, czy w końcu wiązanie przez te białka lipidów bakteryjnych z systemu ekspresyjnego lub endogennych kwasów tłuszczowych, które wiązały się z wysokim powinowactwem i nie udawało się ich usunąć. Dobrym rozwiązaniem okazało się „structure-based design approach”, czyli planowanie mutacji na podstawie istniejących struktur krystalograficznych pokrewnych białek. Najlepsze mutanty białkowe zostały przeanalizowane pod względem strukturalnym, ze szczególnym uwzględnieniem kieszeni wiążącej. Zostały one następnie poddane kolejnym mutacjom mającym na celu zmianę preferencji wiązania ligandów. W badaniach tych nieco zabrakło mi zastosowania wysokoprzepustowej metody (np. opartej na zmianach właściwości fluorescencyjnych sondy) pozwalającej na ilościową

ocenę wiązania ligandów. Takie podejście pozwoliłoby przeprowadzić badania *screeningowe* dużych bibliotek związków. Myślę, że takie podejście byłoby znacznie skuteczniejsze w osiągnięciu celu, czyli znalezienia odpowiedniego „cargo” dla zmutowanych białek. Interesujące badania zostały przeprowadzone w kontekście wiązania chloropromazyną, związkiem z grupy leków przeciwpsychotycznych, który jest antagonistą receptorów dopaminowych. Te badania wydają mi się bardzo interesujące jednak miałbym ochotę polemizować z Kandydatką w niektórych kwestiach takich jak aspekty stereochemiczne poruszone w autoreferacie. Przykładowo w autoreferacie czytamy, że mamy do czynienia z różnymi konformerami, które są źródłem chiralności cząsteczki, podczas gdy moim zdaniem źródłem chiralności jest asymetryczny atom azotu, w którym zahamowana jest inwersja (racemizacja), czyli tzw. *umbrella effect*. W innych zaś fragmentach wnioski wyciągnięte z badań też są nieco kontrowersyjne. Przykładowo w podsumowaniu tej części Habilitantka pisze w podpunkcie 9: „wykazanie, że nowe warianty FAF oraz FAW są zdolne do wiązania (w fazie krystalicznej) wielu cząsteczek liganda jednocześnie: ligand w kompleksach FAF-DSM oraz FAW-DSM wiązany był nie tylko we wnętrzu  $\beta$ -baryłki, ale także w rejonie interfejsu dimeru i wejścia do  $\beta$ -baryłki; te mutanty mogą być więc szczególnie przydatne w przyszłości do otrzymywania molekularnych transporterów ligandów bioaktywnych”. Moim zdaniem wiązanie kilku ligandów świadczy o braku specyficzności wiązania i przeciwnie, może ograniczać użyteczność tego typu transporterów. Moje nieco krytyczne uwagi nie zmieniają jednak faktu, że w tej części zaprezentowano wiele struktur krystalograficznych zmutowanych białek w stanie wolnym oraz z ligandami. Uważam również, że ten aspekt aplikacyjny, związany z transportem jest wart kontynuacji, choć też nie ukrywam, że w moim odczuciu ten potencjał nie został do końca wyeksploatowany.

Niejako ukoronowaniem cyklu habilitacyjnego dr Loch jest praca dotycząca asparaginaz, których przedstawiciele mają zastosowania terapeutyczne w leczeniu ALL u dzieci. W tym obszarze tematycznym Kandydatka po raz pierwszy wyznaczyła strukturę krystaliczną enzymu ReAV z R. etli (asparaginaza klasy 3). Co więcej okazało się, że białko ReAV ma unikalną topologię przypominającą białka wiążące penicylinę (PBP) lub niektóre  $\beta$ -laktamazy. Enzym ten ma też niezwykle miejsce aktywne zawierające jon cynku o nietypowej koordynacji Cys-Lys-Cys-H<sub>2</sub>O oraz dwie pary Ser-Lys stanowiące potencjalne tandemy katalityczne. Ta praca jest dowodem osiągnięcia większej dojrzałości naukowej badaczki i jest moim zdaniem

niezwykle wartościowa. Pozostaje życzyć więcej takich prac w dorobku w przyszłości, być może już podczas realizacji grantu Sonata Bis.

### **Ocena dorobku naukowego**

Oprócz prac wymienionych w cyklu stanowiącym podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego Kandydatka wymienia 13 prac (oznaczonych literą N) z czego 12 opublikowano po uzyskaniu stopnia doktora, które uzupełniają jej dorobek naukowy. Podobnie jak prace z cyklu są to prace opublikowane w dobrych i bardzo dobrych czasopismach. Prace dr Loch łącznie były cytowane 438 (354 bez autocytowań), a jej H-indeks wynosi 11. Wyniki bibliometryczne Habilitantki można więc określić, że są w granicach normy (nie wyróżniają się ani na plus ani na minus) biorąc pod uwagę jej etap kariery.

Badania naukowe na wysokim poziomie nie są możliwe bez solidnego finansowania, a to stwierdzenie szczególnie prawdziwe jest w obszarze chemii biologicznej i biologii strukturalnej, który to obejmuje badania prowadzone przez dr Loch. Kandydatka wykazuje istotną aktywność na tym polu, uzyskała ona grant Sonata Bis NCN (bardzo doceniane osiągnięcie przez recenzenta), oraz wspomniane wcześniej Stypendium NAWA, którego realizacja niestety nie doszła do skutku z powodów obiektywnych, niezależnych od kandydatki. Ponadto wykazywał aktywność w pozyskiwaniu niewielkiego finansowania z innych źródeł (dotacja celowa dla młodych naukowców MNiSzW oraz Miniatura NCN). Warto też wspomnieć o zaangażowaniu Kandydatki jako wykonawcy w realizację projektu OPUS realizowanego w ICHB PAN. O aktywności naukowej Habilitantki świadczą liczne wystąpienia ustne i plakaty na konferencjach krajowych i zagranicznych.

### **Ocena działalności dydaktycznej, popularyzatorskiej i organizacyjnej**

Dr Joanna Loch ma również szereg osiągnięć nie tylko na polu naukowym ale również w działalności dydaktycznej oraz popularyzatorskiej. Na szczególne wyróżnienie zasługuje koordynowanie i współtworzenie kursów dla studentów kierunku Chemia medyczna takich jak: Metody biologii molekularnej w medycynie, Zaawansowane metody biochemiczne w chemii medycznej, Farmakoproteomika. Prowadzi ona szereg zajęć ze studentami Wydziału Chemii UJ na kierunku chemia, chemia medyczna i inne. Wśród nich są takie przedmioty jak: Chemia analityczna z elementami bioanalizy (Laboratorium, I stopień), Podstawy chemii medycznej (Konwersatorium i Laboratorium, I stopień), Rentgenografia strukturalna biocząsteczek (Laboratorium, I stopień), Laboratorium specjalizacyjne (Laboratorium, I

stopień), Chemia analityczna (Laboratorium, I stopień), Krystalografia (Konwersatorium, I stopień), Chemia biologiczna (Laboratorium, I stopień) Zaawansowane techniki analityczne w chemii medycznej II (Laboratorium, II stopień), Biochemia fizyczna (Laboratorium, II stopień), Zastosowanie metod i technik analitycznych w badaniach sądowych (Laboratorium, II stopień) i inne. Dr Loch ma też imponujący dorobek jeśli chodzi o opiekę nad doktorantami i studentami, czego najlepszym przykładem jest pełnienie funkcji promotora pomocniczego dla 4 doktorantów, kierownika 17 projektów magisterskich, 13 projektów licencjackich oraz opiekę nad kolejnymi 13 pracami magisterskimi i 3 licencjatami. Ten element dorobku naukowego jest imponujący pod względem ilościowym, ale są też dowody na to że w niektórych przypadkach ilość przekłada się w wysoką jakość (nagrody i wyróżnienia osiągnęte przez studentów). Co ważne dr Loch nie unika aktywności związanych z popularyzacją nauki, angażując się w przygotowania materiałów do pokazów w ramach Małopolskiej Nocy Naukowców na Wydziale Chemii UJ, czy wygłaszała referaty na konferencjach studenckich.

#### **Wniosek końcowy**

Podsumowując, dr Joanna Loch jest dojrzałą badaczką, o solidnej pozycji w swoim obszarze naukowym, który stanowi aktualną tematykę badawczą na pograniczu biologii strukturalnej, biochemii i chemii biologicznej. Już na obecnym etapie Kandydatka udowodniła, że jest przygotowana do prowadzenia prac magisterskich i doktorskich, czyli jest w stanie gromadzić wokół siebie młodych badaczy. Udowodniła również swoje umiejętności w zdobywaniu funduszy na realizację ambitnych projektów i publikowaniu rezultatów ich realizacji w dobrych i bardzo dobrych czasopismach w dziedzinie, można więc nazwać ją samodzielną badaczką w pełni gotową na kolejny etap kariery naukowej. Na podstawie przedstawionych mi do oceny materiałów stwierdzam, że dorobek naukowy oraz osiągnięcia naukowe zaprezentowane jako rozprawa habilitacyjna dr Loch są na jej etapie kariery wystarczające. W mojej ocenie spełniają one wszelkie wymagania zwyczajowe oraz ustawowe i popieram jej wniosek do Rady Doskonałości Naukowej o nadanie stopnia doktora habilitowanego.