

**Recenzja rozprawy doktorskiej „Design, synthesis, and structural characterisation of miniproteins, and incorporation of protein-protein interaction inhibition activity” autorstwa Juan Lizandra Perez.**

Praca doktorska powstała na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej pod opieką prof. dr hab. Łukasza Berlickiego. Recenzowana praca doktorska dotyczy: i) chemicznej syntezy krótkich sekwencji aminokwasowych (mniej niż 50 reszt aminokwasowych) zawierających pewną liczbę tzw. niekodowanych reszt aminokwasowych; ii) badania zdolności tych sekwencji do przyjmowania określonej i dobrze zdefiniowanej struktury przestrzennej w określonych warunkach; iii) wykorzystanie syntetycznych sekwencji aminokwasowych do modulowania wybranych procesów biochemicznych na poziomie badań *in vitro* i komórkowym.

Praca napisana jest po angielski, z wyjątkiem krótkiego streszczenia w języku polskim. Jako, że nie władam wyjątkowo biegle językiem angielskim, nie będę się wypowiadał na temat jakości językowej pracy, dość powiedzieć, że treść była zrozumiała. Czasami jedynie miałyby zastrzeżenia do poszczególnych słów/zwrotów użytych w konkretnych kontekstach np. „...interaction is constructed around ...” (strona 9), ja bym użył frazy „...interaction is based on ...”. Jednak jak to napisałem wcześniej takie przypadki nie przeszkadzają w zrozumieniu intencji Autora. Praca rozpoczyna się dość obszernego rozdziału „Introduction” (40 stron) wprowadzających czytelnika w obszar prezentowanych badań. Następnie Autor przedstawia cel swoich badań (rozdział Goals), po którym następuje rozdział „Results and discussion” (97 stron), który jest podzielony wyraźnie na dwie części, każda z części zawiera odrębny podrozdział zawierający konkluzje. Podsumowanie wyników zawarte jest w krótkim rozdziale „Summary”, po którym następuje rozdział „Experimentals” opisujący przeprowadzane badania i eksperymenty od strony technicznej. Pewną niekonsekwencją jest zawarcie w tym rozdziale części wyników np. tabeli przesunięć, chemicznych z pomiarów NMR, charakterystyki chromatograficznej sekwencji peptydowych. Oczywiście w wielu pracach dotyczących syntez chemicznych w rozdziałach opisujących metody umieszcza się charakterystyki fizykochemiczne syntezowanych związków, ale w tym wypadku raczej umieściłbym to w załączniku, a nie jako część rozdziału opisującego metody. Ostatnią częścią pracy jest spis literatury

zawierającym 258 pozycji, pozycje literaturowe przywoływane są tekście w systemie vancouverkim. Cała praca łącznie z cytowaną literaturą mieści się na 193 stronach formatu najbardziej zbliżonego do C5.

W opinii recenzenta tytuł rozprawy jest dość niefortunnie sformułowany użytym określenia zagmatwany. Pierwsza część tytułu jest komunikatywna i jest jasne co autor miał na myśli („Design, synthesis, and structural characterisation of miniproteins”), jednak druga część tytułu jest już bardziej niejednoznaczna i zdecydowanie trudna do zrozumienia. Sądę, że tytuł w brzmieniu: „Miniproteins – design, synthesis, structural characterisation and use/application in protein-protein interaction inhibition activity” byłby bardziej czytelny i oddający zawartość merytoryczną pracy.

Rozdział Introduction jest obszerny i porusza wszystkie aspekty, które są niezbędne do zrozumienia badań opisywanych w dalszych częściach pracy. Autor opisuje znane z literatury sekwencje mini- białek, metody projektowania takich sekwencji oraz stosowanie beta-aminokwasów w celu stabilizacji struktury przestrzennej. Ze względu na podobieństwo treści, można przyjąć, że Autor pisząc ten rozdział w dużej mierze oparł się na pracy przeglądowej „Miniproteins in medicinal chemistry” Agnieszka Ciesiołkiewicz, Juan Lizandra Perez, Łukasz Berlicki. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2022); 71, 128806 (referencja 87 w spisie literatury), której jest współautorem. Trzeba zwrócić uwagę, że autor nie popełnił często spotykanego naruszenia praw autorski majątkowych, czyli bezpośredniego przenoszenia całości pracy, czy rysunków tabel z opublikowanej pracy do treści pracy doktorskiej. Mam jedną uwagę/komentarz dotyczącą tej części pracy. W podrozdziale 1.1. The protein folding problem, Autor zwięźle opisuje teorie mechanizmu fałdowania się białek. Jednak czego brakuje w tych opisach to nawet, krótkiej wzmianki, że mechanizm fałdowania jak i efekt końcowy tego procesu (tzw. struktura natywna) są zależne od dwu czynników: sekwencji aminokwasowej i środowiska w jakiej ta sekwencja się znajduje. Pomijanie środowiska jako pełnoprawnego uczestnika procesu fałdowania i stabilizacji struktury białek (np. gęstość roztworu bezpośrednio wpływa na entropię łańcucha peptydowego), prowadzi do zbyt daleko idących uproszczeń. Sztandarowym przykładem takiego uproszczenia jest stosowanie zwrotu „oddziaływanie hydrofobowe” przez analogie do np. oddziaływania Van der Waalsa. Jednak w przeciwieństwie do oddziaływań Van der Waalsa efekt hydrofobowy nie jest związany z tym, że dwa łańcuchy hydrofobowe przyciągają się wzajemnie z jakąś siłą, tylko jest efektem odpychania się tych łańcuchów od cząsteczek rozpuszczalnika. Brak wzmianki dotyczącej środowiska i jego roli w procesie fałdowania jest o tyle dziwny w swoich badaniach Autor bardzo często zmienia/modyfikuje środowisko reakcji (temperatura, chlorowodorek guanidyny ect.).

Jak napisano powyżej najobszerniejszym rozdziałem pracy jest rozdział „Results and discussion”. Na wstępie omawiania tego rozdziału chcę napisać, że wyniki zawierają olbrzymią ilość materiału badawczego. Autor w trakcie swojej pracy syntezował, oczyszczał i przebadał za pomocą spektroskopii CD prawie ponad sto sekwencji peptydowych (jeśli dobrze liczę sekwencji tych było 108). Z technicznego i punktu widzenia sama synteza, oczyszczanie i wstępne badania CD takiej liczby peptydów wymagały minimum dwu lat nieustannej pracy.

Pierwsza uwaga jaka nasuwa się po przeczytaniu tej części pracy jest następująca. Po syntezie i oczyszczaniu, każdy peptyd jest badany za pomocą spektroskopii CD w celu oszacowania jego zdolności do tworzenia stabilnej struktury przestrzennej. Przy takiej liczbie badanych peptydów wybór spektroskopii CD do szybkiego i taniego oszacowania cech strukturalnych jest jak najbardziej uzasadniony. Jednak przy pracy z peptydami (podobna sytuacja dzieje się też w przypadku białek) w wielu przypadkach mamy do czynienia z oligomeryzacją czy agregacją. Autor w przypadku niektórych eksperymentów opisuje wytrącanie się próbki z roztworu (przykładowo Rysunek 70 peptydy I30, I31, I33) jak rozumiem zjawisko to monitorowano przez wzrokową inspekcję zawartości kuwety i obserwację pojawiania się zmętnienia lub osadu. Z własnego skromnego doświadczenia recenzenta wynika, że zjawisko oligomeryzacji czy agregacji peptydów występuje bardzo często, jednak w przedstawionych wynikach obserwowane jest relatywnie dość rzadko. Może to wynikać z tego że Autor nie stosuje jakiegokolwiek metody/procedury badawczej do sprawdzenia, czy dany peptyd oligomeryzuje czy agreguje (oba te procesy nie muszą prowadzić do wytrącania się próbki z roztworu). Metod do badania tego rodzaju zjawisk jest bardzo wiele przykładowo: natywna spektrometria mas, sączenie molekularne, dynamiczne rozpraszanie światła, ultrawirowanie analityczne i inne, żadna nie jest uniwersalna czy może nie dawać jednoznacznych wyników. Oczywiście wszechstronne badanie pod kątem oligomeryzacji czy agregacji wszystkich sekwencji peptydowych byłoby raczej technicznie niemożliwe, jednak głębsze przebadanie wyselekcjonowanych minibiałek byłoby zdecydowanie pożądane i uzasadnione z punktu widzenia naukowego.

W pierwszej części rozdziału „Results and discussion” autor przedstawia wyniki badań dotyczących wypracowania metodologii mającej na celu znalezienie sekwencji aminokwasowej zdolnej do utworzenia stabilnej struktury przestrzennej. Ponadto autor założył użycie reszt beta-aminokwasu (trans-ACPC) do stabilizacji struktury przestrzennej, bazując na wcześniejszych rezultatach badań innych autorów. Autor zaprojektował, zsyntetyzował, oczyszczał i przebadał za pomocą spektroskopii CD 50 sekwencji aminokwasowych. Przy projektowaniu sekwencji autor zastosował różne opisywane w

literaturze strategie takie jak: składanie fragmentów, permutacje kołowe. Sekwencje peptydowe wykazujące pożądane cechy (symptomy kooperatywnego zwijania obserwowane za pomocą pomiarów CD), były w dalszych krokach punktowo mutowane w celu poprawienia parametrów termodynamicznych procesu fałdowania. Aby potwierdzić ostatecznie sukces całego procesu dla wybranych sekwencji podjęto próbę ustalenia ich struktury przestrzennych. W przypadku sekwencji **3** i **8** zastosowano technikę rozpraszania małokątowego promieniowania X (SAXS) lecz wyniki tych badań nie były jednoznaczne. W przypadku sekwencji **12** podjęto próbę hodowli kryształów i badań krystalograficznych, w tym przypadku nie udało się otrzymać kryształów rozpraszających promieniowanie X. Sekwencje **39, 43** badano za pomocą symulacji dynamiką molekularną. W przypadku sekwencji **47** udało się określić strukturę przestrzenną minibiałka na podstawie wyników pomiarów z zastosowaniem magnetycznego rezonansu jądrowego, co uwieńczyło sukcesem żmudną pracę autora. Nieco zaskakujące są badania przedstawione w rozdziale 3.1.4. Autor w tym krótkim rozdziale próbuje zmieniać kolejność odcinków sekwencji aminokwasowych odpowiadających elementom struktury drugorzędowej (alfa-helisie (H) i beta-niciom (E)) aby otrzymać o sekwencje o zmienionej topologii drugorzędowej. Zaskakującym elementem tych badań jest wybór sekwencji startowych. Autor wybiera sekwencje **36, 37, 43** mających topologie EHEE i przekształca je w topologię HEEE (sekwencje **48,49,50**). Autor nie podaje uzasadnienia dlaczego jako podstawę do tych badań wybrał sekwencje **36,37, 43** dlaczego np. nie została do tych badań wybrana sekwencje **47** najlepiej do tej pory scharakteryzowana ?

Druga część rozdziału „Results and dissusion” autor próbuje doświadczenia nabyte przy realizacji pierwszej części badań przekuć w praktyczne zastosowania. Autor jako obiekt swoich badań wybrał system białek PD-1/PD-L1 ważny element układu odpornościowego. Białka PD-1/PD-L1 tworzą kompleks i jedną ze strategii terapeutycznych jest blokowanie możliwości tworzenia tego kompleksu poprzez blokowanie miejsca wiązania PD-L1 do białka PD-1 przez ligand, który nie indukuje dalszej kaskady reakcji biochemicznych. Autor rozprawy postanowił zaprojektować minibiałko zdolne do inhibicji tworzenia się aktywnego kompleksu PD-1/PD-L1. Wykorzystując znaną strukturę przestrzenną kompleksu PD-1/PD-L1 zidentyfikowano kluczowe oddziaływania aminokwas-aminokwas oraz ich dystrybucję przestrzenną które to oddziaływania stabilizują stabilizujące kompleks (Rozdział 1.2.1). Autor jako główną metodę oceny stabilności kompleksu PD-1/minibiałko użył interferometrii warstwowej z białkiem PD-1 immobilizowanym na powierzchni pomiarowej. Sekwencje minibiałek o najbardziej obiecujących cechach były w dalszej części badane w testach in vitro z użyciem metody HTRF (Homogeneous Time Resolved Fluorescence). Początkowo autor oparł konstrukcję swoich minibiałek na znanej naturalnie występującej domenie WW (patrz referencja 122). Sekwencja domeny WW była modyfikowana w taki sposób aby nie naruszać istotnych z punktu widzenia

struktury przestrzennej reszt aminokwasowych, a z drugiej strony wprowadzać modyfikacje w taki sposób aby odwzorowywać obserwowaną w kompleksie PD-1/PD-L1 sieć oddziaływań międzycząsteczkowych. Sumarycznie autor przetestował 27 sekwencji aminokwasowych z których część wykazywała zdolność do wiązania się z białkiem PD-1, jednak siła i efektywność tego wiązania była umiarkowana/niska. W kolejnym kroku autor jako wzorzec strukturalny na którym opierał badania była sekwencja **21** testowana w pierwszej części pracy. Autor nie uzasadnia dlaczego akurat punktem startowym do dalszych modyfikacji była ta, a nie inna sekwencja, co ją wyróżniało z pośród innych wcześniej badanych, że została wybrana? Zaprojektowano i przebadano osiem nowych sekwencji, które podobnie jak w przypadku pierwszych badań wykazywały umiarkowaną aktywność biochemiczną. W trzeciej próbie autor oparł serię minibiałek o sekwencję **25**, podobnie jak to było poprzednio znów nie ma uzasadnienia dlaczego ta a nie inna sekwencja została wybrana do dalszych badań? Na podstawie sekwencji **25** zaprojektowano i przebadano cztery kolejne sekwencje z których dwie wykazywały obiecujące parametry w testach z zastosowaniem interferometrii warstwowej i HTRF. Te dwa preparaty przetestowano stosując eksperymenty na liniach komórkowych. Niestety wyselekcjonowane związki były zdecydowanie słabszymi ligandami dla białka PD-1 niż stosowany w terapii ligand Durvalumab. W czwartej próbie badawczej autor zastosował sekwencję **46** jako sekwencje bazową (znów bez podania uzasadnienia wyboru). Na podstawie sekwencji **46** wygenerowano serię kolejnych wariantów z których sekwencja **O\_113** wykazywała dość znaczną aktywność we wszystkich przeprowadzanych testach in vitro i in vivo. Wielka szkoda, że autor nie pokusił się aby wykonać porównawcze eksperymenty dla Durvalumab w tych samych warunkach i używając tych samych technik, tak aby można było bezpośrednio porównać aktywność biologiczną zarejestrowanego już preparatu terapeutycznego i np. sekwencji **O\_113**. Druga uwaga, to np. brak przy badaniach z zastosowaniem interferometrii jakiejś kontroli negatywnej, zdecydowanie do tych relatywnie prostych badań użyłbym jako kontroli negatywnej jakiejś sekwencji, która nie ma tendencji do tworzenia struktury przestrzennej, tak aby wykazać, że struktura jest warunkiem wiązania do białka PD-1.

Pominę omawianie Podsumowania pracy, gdzie autor podsumowuje najważniejsze osiągnięcia. Rozdział „Experiments” jest napisany w sposób dość zwarty, ale na tyle czytelny, że nie byłoby problemów z odtworzeniem wykonywanych eksperymentów. Wyraźnie daje się zauważyć, że w opisach wyników Autor powtarza (czasami wielokrotnie) szczegóły techniczne eksperymentu opisane w części „Experiments”. Praca i tak jest obszerna zawiera dużo tabel, rysunków, a takie powtórzenia komplikują odbiór. Być może pomysł z opisem metodologii na końcu pracy nie był dobry rozwiązaniem i umieszczenie opisu metod i wyjaśnienie ich znaczenia przed opisami wykonanych prac pozwoliłoby na uniknięcia

nadmiaru tekstu. Co należy zaznaczyć jako bardzo budujące, że autor zastosował bardzo szeroką gamę technik/metod/procedur badawczych. Nie mam wątpliwości, że autor nie był w stanie opanować tych wszystkich technik/metod/procedur badawczych (co nie jest zarzutem), zresztą autor podaje często w tekście pracy podaje informacje o współpracownikach biorących udział w realizacji projektu.

Jak to wspominałem na wstępie praca zawiera olbrzymi materiał eksperymentalny, sama praca jest obszerna więc siłą rzeczy jest pewna liczba jakiś niedociągnięć technicznych i redakcyjnych (np. Rysunek 48 skrót Cpt), ale te potknięcia nie utrudniają odbioru i nie umniejszają wartości samych wyników. Tym niemniej polecałbym autorowi np. w czasie pracy nad publikacją przedstawianych wyników na bardziej przemyślane ich przedstawienie, w bardziej zwartej formie ze skupieniem się na najistotniejszych obserwacjach. Mam nadzieję, że jedynie ze względu na presję czasu przedstawione wyniki nie zostały jeszcze opublikowane w recenzowanym czasopiśmie naukowym.

Podsumowując, najważniejsze osiągnięcia zawarte w pracy, autor: i) wyselekcjonował kilkanaście sekwencji aminokwasowych o długości mniejszej niż 50 reszt aminokwasowych, które wykazują cechy charakterystyczne dla białek globularnych; ii) dla jednej z tych sekwencji wykazał badaniami strukturalnymi, że sekwencja ta przyjmuje stabilną strukturę przestrzenną w roztworze; iii) opisał kilka sekwencji aminokwasowych mających cechy termodynamiczne białek globularnych, które mają umiarkowaną aktywność w modulowaniu tworzenia kompleksu białek PD-1/PD-L1, osiągnięcie to ma praktyczny wymiar w aspekcie projektowania nowych substancji terapeutycznych. W mojej opinii przedstawione w rozprawie doktorskiej wyniki badań spełniają warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2021 poz. 478 z późniejszymi zmianami). W związku z tym wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Pana Juan Lizandra Perez do dalszych etapów postępowanie w sprawie nadania stopnia doktora.

St. Oty