



Poznań, 23 lutego 2024 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej pani mgr inż. Agnieszki Ciesiołkiewicz
pt. „Projektowanie, synteza i aktywność biologiczna inhibitorów oddziaływania PD-1/PDL1
bazujących na minibiałkach” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Łukasza Berlickiego**

Kompleksy białkowe pełnią kluczową rolę w koordynacji wielu procesów biologicznych. Zrozumienie mechanizmów oddziaływania biomolekuł oraz znajomość oddziaływań mających znaczenie w rozwoju stanów patologicznych pomaga w projektowaniu nowych i ulepszaniu znanych narzędzi terapeutycznych. Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pani mgr inż. Agnieszki Ciesiołkiewicz wpisuje się w nurt opisanych powyżej badań. W swojej pracy Autorka postawiła za cel opracowanie inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1 opartych na minibiałkach. Ponieważ szlak PD1/PD-L1, jest wykorzystywany przez komórki nowotworowe do ucieczki przed układem immunologicznym, a mechanizm tego procesu nie jest w pełni wyjaśniony, badania podjęte przez Kandydatkę mają duże znaczenie naukowe i aplikacyjne.

Wyniki swojej pracy Doktorantka przedstawia w formie monografii o nietypowej strukturze. Rozprawa liczy 190 stron, jest napisana w języku polskim, opatrzona streszczeniem w języku angielskim, wykazem skrótów, zawiera wstęp, cel pracy, opis wyników wraz z dyskusją, podsumowanie, uwzględnia część eksperymentalną oraz bibliografię.

Głównym *Celem pracy* jest opracowanie nowych inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1. Cel pracy jest zrozumiały, a następująca po nim zawartość jest logiczna i konsekwentnie zaplanowana eksperymentalnie. W pracy zastosowano dwa podejścia: jedno oparte na wykorzystaniu stabilnego konformacyjnie znanego minibiałka, drugie w oparciu o projektowanie *de novo*. Rozdział *wstęp* doskonale wprowadza w tematykę rozprawy. Zawiera charakterystykę receptora PD-1 oraz obu ligandów PD-L1 i PD-L2. Tę część pracy przeczytałam z wielkim zainteresowaniem. Szczególnie pragnę podkreślić biegłość Doktorantki w opisie inhibitorów oddziaływania PD1/PD-L1 oraz



zręczność w opisie typów minibiałek. Ta ciekawa, wciągająca i jednocześnie wymagająca lektura sprawiła, że umknęły mi typowe niedociągnięcia popełniane w tej części rozprawy. Generalnie w pracy zastosowano prawidłowe cytowania.

W pierwszej części rozdziału *Wyniki i dyskusja* Doktorantka przeprowadziła syntezę peptydowego inhibitora oddziaływania PD1/PD-L1 (pAC65). Za pomocą testu HTRF i testu ICB przedstawiła właściwości hamujące pAC65, odnosząc jedynie wartości EC50 otrzymanych do analogicznych wartości otrzymanych dla wybranych przeciwciał. Doktorantka przedstawiła także proces krystalizacji i strukturę krystaliczną pAC65, doprecyzowując, że te badania zostały zrealizowane przez zespół afiliowany na Wydziale Chemii UJ i nie są publikowane. W tym przypadku nie mam jasności jaka część przedstawionych wyników jest autorstwa Doktorantki.

Podczas opracowywania tego rozdziału Doktorantka nie uniknęła pewnych błędów. Mam zastrzeżenia do opisów rysunków, które poza tytułem w zasadzie w ogóle ich nie zawierają. Jako przykład podam rys. 21, który nie zawiera istotnych informacji umożliwiających jego interpretację. Brakuje stosownego tytułu, wykresy mają niepełne opisy: rys.21A zamiast „logC [M]” powinno być „stężenie inhibitora log [M]”, wartość IC50 nie jest dookreślona wartością Chi^2 , nie podano w jaki sposób normalizowano wartość HTFR. Rys21B jest „RLU” a powinno być „%RLU max”; co było kontrolą pozytywną w testach; jak należy rozumieć RLU? Ciekawi mnie także czy Doktorantka sprawdziła poziom dimeryzacji PD1/PD-L1 w swoim układzie eksperymentalnym?

W drugiej części pracy Doktorantka skupiła się na projektowaniu inhibitorów na bazie struktur znanych minibiałek: wiliny i ENH. Strategia projektowania obejmowała utrzymanie stabilnej struktury pochodnych minibiałek i zwiększenie ich powinowactwa do PD-L1, poprzez zmianę wybranych reszt aminokwasowych (aa) potencjalnie kluczowych dla oddziaływania z PD-L1. W pracy przetestowano łącznie 42 cząsteczki o zaprojektowanym potencjale inhibitorowym. Na bazie wiliny Autorka opracowała 6 potencjalnych inhibitorów (V1-V6), z których dwa V5-V6 cechowały się wyższą stabilnością i praktycznie podobnym powinowactwem do PD-L1 co wilina (V0). Po wyczerpaniu potencjału rusztowania wiliny (35 aa) Doktorantka kontynuowała badania z wykorzystaniem rusztowania minibiałka ENH, które jest od niej dłuższe – zawiera 54 aa. Strategia projektowania potencjalnych inhibitorów była podobna, ale w celu ułatwienia syntezy, minibiałko zostało skrócone



na obu końcach łącznie o 8 aa. W tym przypadku, w wyniku dwóch rund optymalizacji w kierunku zwiększenia powinowactwa do PD-L1 i poprawy rozpuszczalności, przetestowano 36 pochodnych minibiałek; dwa minibiałka - E24 i E32 wykazały brak cytotoksyczności oraz znacząco wysoką aktywność hamującą oddziaływanie PD1/PD-L1 w środowisku o pH 6.9. Dalsza optymalizacja wariantu E32 skutkowałą opracowaniem trzech pochodnych E34-E36, które w analizie BLI i w porównaniu do E32 charakteryzowały się wyższym powinowactwem do PD-L1, ale brakiem lub niską aktywnością inhibitorową w teście HTRF.

W ostatniej części rozdziału Doktorantka przedstawiła projektowanie *de novo* potencjalnych inhibitorów peptydowych zawierających α i β aminokwasy. W tym podejściu opracowała 37 minibiałek, 7 sekwencji (K1-K7) powstało oparciu o 5UP1, a dalsza optymalizacja w oparciu o K7 przyniosła kolejne potencjalne inhibitory, które z uwagi na właściwości przebadano jedynie częściowo. Wśród nich znalazło się rusztowanie O5 wykazujące obiecujące cechy strukturalne.

Mam uwagę do rozdziału *Wyniki i dyskusja*. Niestety zabrakło w nim klasycznej dyskusji. Chociażby omówienia wyników na tle badań zespołu lub na tle wyników innych grup zajmujących się podobną problematyką. Interesuje mnie także opinia Autorki czy użyta w pracy strategia projektowania inhibitorów może mieć zastosowanie w innych układach biologicznych. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę są bezsprzecznie oryginalne, ale zostały uzyskane w oparciu o jedno i to samo miejsce dokowania. Zastanawiam się, czy na obecnym etapie Autorka widzi możliwość optymalizacji miejsca wiązania potencjalnego inhibitora. Proszę Autorkę o komentarz podczas obrony.

Rozdział *Część eksperymentalna* zawiera listę dostawców i spis metod użytych w pracy, opatrzonych komentarzem. Po lekturze tego fragmentu stwierdzam, że mógłby on być odpowiednikiem klasycznego rozdziału Materiały i Metody. Jednak w mojej opinii opisy są raczej ogólnikowe, a powinny zawierać wskazówki do wystandaryzowanych warunków eksperymentu i umożliwić jego powtórzenie.

Na zakończenie pragnę podkreślić, że za najważniejszy wynik tej pracy uważam przygotowanie rusztowań E24, E32 oraz w szczególności rusztowania O5, które wydaje się mieć obiecujące cechy



strukturalne w kierunku projektowania potencjalnych inhibitorów. Z obowiązku recenzenta dodam, że Doktorantka nie ustrzegła się potknięć edycyjnych, błędów stylistycznych, tzw. skrótów myślowych, żargonu, angielszczyzny, oraz niepoprawnie używała terminów biologicznych. Ilość tego typu potyczek przekroczyła w mojej ocenie standardowy poziom. Odniosłam wrażenie, że praca została przygotowana w pośpiechu.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pani mgr inż. Agnieszki Ciesiołkiewicz jest nowatorska, dostarcza obszernej i nowej wiedzy na temat projektowania inhibitorów opartych na minibiałkach. Autorka potrafi prowadzić samodzielne badania naukowe w dziedzinie, którą reprezentuje. Zgłoszone powyżej komentarze i uwagi nie umniejszają wartości poznawczej wyników - stanowią jedynie podstawę do dalszej dyskusji. Dlatego stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). Na tej podstawie wnoszę o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów postępowania.