



Prof. Łukasz Berlicki
Katedra Chemii Bioorganicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław
lukasz.berlicki@pwr.edu.pl

**Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Piotra Ciury, pt.: „Blokowanie oddziaływań
wybranych punktów kontrolnych przy wykorzystaniu peptydów – innowacyjne
podejście do immunosupresji”**

Pan mgr inż. Piotr Ciura wykonał pracę doktorską pod opieką prof. Adama Sieradzana oraz dr hab. Marty Spodziei (promotor pomocniczy) w Katedrze Chemii Teoretycznej oraz w Katedrze Chemii Biomedycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Głównym celem rozprawy było opracowanie peptydów hamujących oddziaływanie białko-białko, tj. HVEM-LIGHT, w celu modulowania aktywności układu immunologicznego.

Kontrola układu immunologicznego człowieka jest w ostatnim czasie tematem wzbudzającym szerokie zainteresowanie społeczności naukowej ze względu na możliwości opracowania nowych terapii dla wielu problematycznych chorób. Z jednej strony aktywacja układu immunologicznego może być zastosowana w leczeniu wybranych nowotworów. Z drugiej strony ograniczenie aktywności tego układu można wykorzystać w terapii chorób autoimmunologicznych. W ostatnich latach zidentyfikowano szereg oddziaływań białko-białko, które kontrolują aktywność układu immunologicznego, tzw. punktów kontrolnych. Stanowią one obecnie wartościowe cele molekularne dla nowych terapii. W tym kontekście praca doktorska Piotra Ciury wpisuje się bardzo dobrze w nowoczesne trendy chemii medycznej. Niewątpliwie podjęty temat badawczy dotyczący nowych peptydowych

inhibitorów HVEM-LIGHT stanowi znaczące wyzwanie naukowe, a także ma istotny aspekt potencjalnej aplikacyjności.

Praca doktorska mgr. inż. Piotra Ciury bazuje na trzech oryginalnych artykułach naukowych. Prace są spójne tematycznie i zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych (*Journal of Physical Chemistry B*, *Bioorganic Chemistry* oraz *Scientific Reports*). Warto podkreślić, że we wszystkich publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem. Dołączone oświadczenia współautorów wszystkich prac pozwalają na jednoznaczne określenie zakresu badań wykonanych przez Doktoranta.

Rozprawa doktorska składa się z omówienia prac stanowiących jej podstawę (75 stron), oświadczeń współautorów oraz właściwych artykułów z materiałami dodatkowymi. Omówienie zawiera streszczenia (w j. polskim i angielskim), wprowadzenie, cel pracy, materiały i metody, opis każdej publikacji z cyklu, podsumowanie, dorobek naukowy Kandydata oraz bibliografię. W zastosowanej konwencji pracy doktorskiej bazującej na opublikowanych artykułach, w opinii recenzenta, część „materiały i metody” nie jest potrzebna, ponieważ nie stanowi omówienia artykułów, a jedynie kopiuje ich fragmenty. Wyjątkiem w tym zakresie jest uzupełnienie dotyczące charakterystyki otrzymanych peptydów z zastosowaniem spektrometrii masowej oraz analitycznej wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Pomimo tego, że we wszystkich pracach wykazana jest synteza peptydów, nie zawierają one tych danych. W przypadku raportowania widm MS powinno się podawać teoretyczne oraz obserwowane wartości m/z . Nie jest też jasne, jakiego aparatu użyto i czy rejestrował widma wysokiej rozdzielczości.

Omówienie opublikowanych prac zostało napisane poprawnym językiem polskim i jest starannie zredagowane. Błędów językowych jest niewiele i w większości nie mają one wpływu na odbiór pracy. Warto może zauważyć, że konformacja cząsteczek jest z definicji przestrzenna; nie ma powodów, aby to podkreślać (strona 49). Natomiast w odniesieniu do wiązań disiarczkowych należy używać słowa „liczba”, a nie „ilość”, ponieważ są one policzalne. Trzeba jednakże podkreślić wysoką jakość rysunków, które znacząco ułatwiają zrozumienie rozprawy.

Wstęp do pracy liczy 20 stron i stanowi bardzo dobre wprowadzenie do jej tematyki. Otrzymujemy logicznie ułożony zestaw informacji, poczynszy od budowy układu immunologicznego i aktywacji limfocytów, poprzez zestawienie punktów kontrolnych, aż po szczegółowe dane o białkach HVEM i LIGHT. Omówiono ich struktury, oddziaływania, rolę w chorobach autoimmunologicznych oraz znane inhibitory. Czy znane są stałe wiązania białek

lub przeciwciał wiążących się z badanymi białkami lub struktury ich kompleksów z tymi celami molekularnymi?

Pierwsza praca z cyklu zaprezentowanego przez mgr. inż. Piotra Ciurę dotyczy obliczeń oddziaływań białek HVEM i LIGHT oraz peptydów bazujących na HVEM z białkiem LIGHT. Na podstawie obliczeń relatywnie długich dynamik molekularnych szczegółowo przeanalizowano oddziaływania obu białek i wskazano domenę CRD2 białka HVEM jako kluczową w oddziaływaniach z partnerem. W połączeniu z analizą MM-GBSA możliwe było zaproponowanie serii peptydów, które mogłyby hamować badane oddziaływanie. W szczególności wskazano mutacje domeny CRD2, które mogłyby zwiększyć energię wiązania z celem molekularnym.

Naturalną kontynuacją pierwszej pracy jest artykuł w *Bioorganic Chemistry*, w którym opisano eksperymentalną walidację wcześniej zaproponowanych peptydów. Wykazano, że opracowane cząsteczki wiążą się z celem molekularnym ze stałą wiązania w zakresie mikromolarnym. Co ważne, zaproponowana mutacja K54E zwiększa powinowactwo peptydu do białka LIGHT. Udowodniono także hamowanie oddziaływania HVEM/LIGHT *in vitro* i w komórkach. Jaką metodologię można by zastosować, aby opracować analogi badanych peptydów o większym powinowactwie do tego celu molekularnego?

Publikacja nr 3 w czasopiśmie *Scientific Reports* jest logicznym dopełnieniem całego cyklu, ponieważ zaprojektowane zostały peptydy bazujące na fragmentach białka LIGHT, które wiążą się z HVEM. Wycięte fragmenty β -kardki zostały ustabilizowane poprzez wprowadzenie reszt cysteiny, które pozwoliły na makrocyclizację peptydów. Najaktywniejsze peptydy wykazywały stałą dysocjacji K_d poniżej 1 μ M. Eksperymentalnie udowodniono także możliwość inhibicji oddziaływania HVEM/LIGHT. Co ważne, eksperymenty potwierdziły wyniki obliczeń, które wskazywały peptyd light3 i jego mutantu jako najaktywniejsze. Jednocześnie stałe dysocjacji skonstruowanych peptydów są zbliżone do stałej dysocjacji białka LIGHT, co potwierdza poprawną identyfikację fragmentu tego białka odpowiedzialnego za wiązanie partnera.

Podsumowując, pracę doktorską mgr. inż. Piotra Ciury oceniam bardzo dobrze. Doktorant podjął się rozwiązania trudnego problemu badawczego, który nie był dotychczas eksplorowany przez inne grupy badawcze. Bardzo skutecznie połączył zaawansowane symulacje molekularne z pracą eksperymentalną. Warto podkreślić, że wiele wyników eksperymentalnych potwierdziło wcześniejsze obliczenia, co jednoznacznie wykazuje wysoką jakość pracy mgr. inż. Piotra Ciury. Jednocześnie szeroki zakres kompetencji badawczych Doktoranta niewątpliwie przyczynił się do zakończenia projektu z sukcesem oraz opracowania

aktywnych inhibitorów wybranego oddziaływania białko-białko. W związku z powyższym, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana mgr. inż. Piotra Ciury spełnia ustawowe wymogi stawiane pracom doktorskim. Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne na Uniwersytecie Gdańskim o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana mgr. inż. Piotra Ciury do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Julian Berlek