

Recenzja

pracy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Anny Bojko

pt. „Searching for peptides interacting with the PD-1 and PD-L1 immune checkpoint proteins for cancer immunotherapies”

Recenzowana rozprawa doktorska jest efektem prac prowadzonych w Katedrze Chemii Biomedycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Sylwii Rodziewicz-Motowidło i dr Marty Spodzieja. Część prac opisanych w rozprawie realizowana była w laboratoriach jednostki *Division of Immune Receptors and T-cell Activation*, zlokalizowanej na Uniwersytecie Medycznym w Wiedniu, której kierownikiem jest prof. Priv.-Doz. Mag. Dr. Peter Steinberger.

Tematyka badań opisanych w recenzowanej rozprawie dotyczy projektowania, syntezy, testowania aktywności i optymalizacji struktur chemicznych peptydowych związków, mających za zadanie blokowanie oddziaływania pomiędzy białkiem programowanej śmierci komórki (PD-1) i jego ligandami (PD-L1 i PD-L2). Wraz z dopuszczeniem do stosowania w klinice przeciwciał terapeutycznych blokujących białko CTLA-4 (ipilimumab, 2011 rok) oraz białko PD-1 (pembrolizumab i nivolumab, 2014 rok) otwarte zostały nowe możliwości terapeutyczne dla pacjentów cierpiących na trudne do leczenia typy nowotworów, takie jak czerniak czy niedrobnokomórkowy rak płuca. Wysoka skuteczność wspomnianych oraz wprowadzanych w kolejnych latach przeciwciał celujących w punkt kontrolny PD-1/PD-L1 potwierdzona została licznymi badaniami klinicznymi, a autorzy pionierskich prac badawczych prowadzonych nad immunologicznymi punktami kontrolnymi uhonorowani zostali przyznaniem w 2018 roku Nagrody Nobla. Jednocześnie podkreślić należy, że wszystkie preparaty dopuszczone obecnie do klinicznego stosowania na potrzeby terapeutycznego blokowania immunologicznego punktu kontrolnego PD-1/PD-L1, będącego w centrum prac opisanych w recenzowanej rozprawie, bazują na przeciwciałach monoklonalnych. Idąc w ślady sukcesu klinicznego i komercyjnego tych preparatów na całym świecie prowadzone są prace doświadczalne, mające na celu

wprowadzenie związków o podobnym działaniu, lecz odmiennym od przeciwciał monoklonalnych charakterze chemicznym, w tym przede wszystkim związków małowcząsteczkowych, peptydów i peptydomimetyków. Należy podkreślić, że pomimo prowadzonych licznych prób, w tym także testów klinicznych, żaden z tych związków nie doczekał się nadal uznanego w szerszym świecie dopuszczenia do stosowania w terapii, nie wspominając o przyspieszonych procedurach, jakie obserwowano dla wybranych zastosowań przeciwciał blokujących białka PD-1 albo PD-L1. Kwestia ewentualnego zastąpienia rzeczonych przeciwciał terapeutycznych innymi preparatami, lub choćby wprowadzenia do kliniki alternatywnych preparatów opartych o związki małowcząsteczkowe albo peptydowe jest więc nadal otwarta. W tym świetle tematyka badań opisanych w recenzowanej rozprawie wpisuje się w najnowsze trendy prac badawczych prowadzonych w zakresie innowacyjnych terapii przeciwnowotworowych

Rozprawa doktorska Pani Magdaleny Anny Bojko sporządzona jest na 177 stronach, zredagowanych w sposób standardowy dla tego typu prac. Składa się ona z 6 rozdziałów, wśród których najobszerniejsze to Wstęp (45 stron, 25,4 % pracy), Wyniki (55, 31,1 % pracy), Dyskusja (19, 10,7 % pracy) i Materiały i Metody (17 stron, 9,6 % pracy). Opisywane w pracy zagadnienia zobrazowane są za pomocą licznych, kolorowych rycin oraz gromadzących zebrane dane tabel, ułatwiających śledzenie prezentowanego w tekście materiału.

Rozprawę doktorską, pomijając standardowe elementy jak strona tytułowa, podziękowania, spis treści i lista skrótów, rozpoczynają streszczenia, sporządzone w języku angielskim oraz polskim, które spełniają swoją funkcję poprawnie podsumowując całość pracy. Rozdział zatytułowany Wstęp merytorycznie stanowi bardzo dobre wprowadzenie do złożonej problematyki badawczej, której dotyczy rozprawa. Autorka zgrabnie przeprowadza czytelnika od zagadnień ogólnych do bardziej szczegółowych, skupiając uwagę na wyłuskanych aspektach, trafnie uznanych za istotne dla dalszych rozważań i z punktu widzenia zawartości kolejnych rozdziałów. Godnym pochwały pomysłem jest także zamieszczenie pod koniec tego rozdziału opisów wybranych zaawansowanych metod badawczych zastosowanych w toku prowadzonych prac badawczych, które pozwolą czytelnikowi na lepsze zrozumienie uzyskanych wyników bez sięgania do dodatkowych

źródeł oraz na nabranie przekonania, że Autorka zna podstawy teoretyczne stosowanych technik laboratoryjnych.

W tym miejscu recenzji wspomnieć należy, że rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Anny Bojko sporządzona została w języku angielskim, co w oczach recenzenta zasługuje na pochwałę ze względu na możliwość dzielenia się w przyszłości zawartością pracy również z osobami nie władającymi językiem polskim. Należy jednak podkreślić, że w opinii recenzenta praca zyskała by na jakości gdyby dokonano dodatkowej korekty językowej i usunięto błędy, których najwięcej zawiera właśnie wstęp. W całej pracy odnaleźć można literówki (np. „samples were centrifuge”, „peptides were cleavage”, „did not mentioned”, “they confirms”, “In inhibit complex”, “examined”). Zdarzają się także zwroty zapożyczone z języka polskiego, jak „ T cells CD4+” zamiast „CD4+ T cells”, czy określenia nieprecyzyjnie opisujące faktyczne zjawiska molekularne, jak „assessed by the measurement of the transcriptional level of eGFP” (podczas gdy mierzono fluorescencję białka, a nie ilość transkryptu).

W rozdziale Wyniki doktorantka skrupulatnie opisuje wykonane w ramach projektu prace badawcze, których zakres jest imponujący a charakter interdyscyplinarny. Wymieniając za Autorką, Pani mgr Bojko przeprowadziła: (1) projektowanie peptydów celujących w białka PD-1 albo PD-L1 bazując na analizie powierzchni zaangażowanej w oddziaływanie tych dwóch białek, (2) syntezę chemiczną zaprojektowanych peptydów z zastosowaniem metody SPPS, (3) oczyszczanie i analizę uzyskanych produktów, (4) procedury testowania oddziaływania produktów z białkowymi celami molekularnymi z zastosowaniem metod SPR i ELISA, (5) charakterystykę stabilności peptydów w pożywce hodowlanej, (6) charakterystykę toksyczności peptydów względem komórek modelowych, (7) oznaczenie kompetycji oddziaływania peptydów i naturalnych ligandów białkowych z receptorami na powierzchni komórek modelowych, (8) testy bioaktywności uzyskanych peptydów z zastosowaniem ko-hodowli komórkowych, i wreszcie (9) próbę poprawy właściwości peptydów należących do wybranej grupy w oparciu o uzyskane wyniki badań, w tym wyniki analizy konformacyjnej uzyskanej z zastosowaniem spektroskopii NMR. Zakres prac wykonanych samodzielnie świadczy o szerokim spektrum umiejętności laboratoryjnych, jakimi pochwalić się może Pani Magdalena, a sposób prowadzenia prac,

ich ukierunkowywanie i realizacja kolejnych kroków w oparciu o uzyskane wyniki z wykonanych uprzednio doświadczeń o dojrzałości naukowej Doktorantki oraz bardzo dobrym wsparciu opiekunów naukowych. Na uznanie zasługuje także fakt, że rozprawa doktorska nie pozostawia wątpliwości co do tego które prace wykonane zostały przez Doktorantkę, a które przez inne zaangażowane osoby. Doktorantka jasno wskazuje momenty, w których korzystała z wyników prac innych osób (jak symulacje przeprowadzone przez mgr Małgorzatę Kogut (str. 62), czy dokowania i symulacje dynamiczne dr Adama Sierdzana (str. 84 i 133)) albo z wsparcia dodatkowych wykonawców (pomiar SPR przy udziale dr Katarzyny Węgrzyn (str. 68), czy badania komórkowe prowadzone pod nadzorem Claire Battin, PhD (str. 78)). Jest zrozumiałe, że takie współprace są konieczne dla prowadzenia interdyscyplinarnych prac badawczych, a zaangażowanie w ich wykonanie wyspecjalizowanego personelu zwiększa wiarygodność uzyskanych wyników, daje szansę na poszerzenie własnych umiejętności i stanowi dowód na dojrzałość naukową głównego wykonawcy projektu.

Na pochwałę zasługuje także fakt, że wiele doświadczeń zaprezentowanych w rozprawie przeprowadzonych zostało z zachowaniem przyjętej jako konieczna dla oznaczeń biologicznych liczby powtórzeń (dot. rycin 36, 39, 40, 44, 46 i innych), a uzyskane wyniki zostały przeanalizowane z wykorzystaniem testu ANOVA. Ze względu na brak wglądu w dane wyjściowe oraz niskie wartości parametru p uzyskane w teście Dunnetta rodzi się jedynie pytanie o sposób potraktowania danych opisanych jako tryplikaty. Na przykładzie ryciny 63: opis wskazuje, że pokazane wartości to wartości średnie \pm odchylenie standardowe, ale brak jest opisu czy było to średnie wartości z wartości średnich uzyskanych dla poszczególnych powtórzeń ($n = 3$), czy może wartości średnie wszystkich uzyskanych odczytów ($n = 9$). Ta kwestia wymaga dodatkowego wyjaśnienia i powinna znaleźć się albo pod każdą ryciną, której dotyczy, albo zbiorczo w rozdziale Materiały i Metody.

Rozdział Dyskusja stanowi podsumowanie opisanych w rozprawie wyników wraz z ich interpretacją i umiejscowieniem w literaturze naukowej dotyczącej podobnych zagadnień badawczych. Doktorantka obszernie komentuje wyniki uzyskane dla własnych peptydów w odniesieniu do ich sekwencji, modyfikacji i analogicznych manipulacji raportowanych w doniesieniach innych grup badawczych. Pani Magdalena wskazuje także

w których elementach wyniki uzyskane przez Zespół stoją w sprzeczności z tymi doniesieniami. Efektem przeprowadzonych prac i analiz było wytypowanie peptydów, które najlepiej sprawdziły się w testach biologicznych (peptydy (7) i (10), skierowane na białko PD-L1 oraz (L11) i (L17), skierowane na białko PD-1). Próba poprawy właściwości peptydu (10) poprzez poparte racjonalnymi przesłankami utrwalenie struktury spinki do włosów zakończyła się niepowodzeniem, co również zostało przez Doktorantkę szczegółowo opisane. Jednostronicowe podsumowanie (*Conclusions*) pozwoli czytelnikowi szybko zorientować się w efektach przeprowadzonych prac badawczych.

Wnikając nieco bardziej w szczegóły przeprowadzonych analiz pojawia się kilka dodatkowych kwestii, w przypadku których chciałbym poprosić Doktorantkę o dodatkowe wyjaśnienia.

1. W przypadku testowania wpływu peptydów wywodzących się z białka PD-L1 na „żywołność” komórek linii TCS zaobserwowano odczyty sięgające wartości 120% względem komórek kontrolnych. W tekście zjawisko to pisano jako „cells proliferation”, albo „increase of living cells” (str. 101 i 114). Czy przeprowadzony test faktycznie uprawnia do jednoznacznego stwierdzenia, że mamy do czynienia z wzmożoną proliferacją komórek pod wpływem zastosowanych peptydów?
2. Rycina 66 stanowi bardzo cenne potwierdzenie charakterystyki stosowanych komórek modelowych. Ukazane dane jednoznacznie wskazują na podwyższoną ekspresję białek PD-1, PD-L1 i CD86 w komórkach, które powinny cechować się taką ekspresją. Mam jednak wątpliwość w stosunku do parametru opisanego jako „aCD3”. Zgodnie z opisem jest to *membrane-bound anti-human CD3 single-chain variable fragment (scFv)*, a śledząc zacytowaną publikację dowiadujemy się, że jest to sztuczny receptor CD5L-OKT3scFv-CD14, a więc posiadający domenę znanego przeciwciała anty-CD3, klon OKT3. Pojawia się zatem pytanie w jaki sposób dokonano detekcji tego receptora z zastosowaniem cytometrii przepływowej? W rozdziale Materiały i Metody odnaleźć można informację jedynie o przeciwciałach wykrywających PD-1, PD-L1, CD-86 oraz innym przeciwciele wykrywającym receptor CD3 (klon UCHT-1). Używano także dwóch

przeciwciał drugorzędowych, jednak wykrywających fragmenty Fc a nie Fv przeciwciał IgG. Bardzo proszę o uzupełnienie tej kwestii.

3. Kolejne pytanie dotyczy testu nazwanego w pracy *Competitive assay at the cellular level*. W teście tym prowadzi się inkubację komórek posiadających ekspresję PD-1 albo PD-L1 z białkowym partnerem (odpowiednio PD-L1 albo PD-1) zawierającym metkę Fc, a następnie detekcję tej metki z zastosowaniem odpowiedniego przeciwciała. Kolejne kroki inkubacji oddzielone są odwirowywaniem (5 min) oraz przemywaniem próbek. Zważywszy na relatywnie szybki proces oddysocjowywania białka PD-1 od PD-L1 (Rycina 33, $kd = 2,13 \times 10^{-2}$), czy nie zachodzi obawa, że w trakcie procedury białko-partner oddysocjuje z powierzchni komórki, a obserwowany efekt jest efektem niespecyficznym?
4. Wnioskiem płynącym z Ryciny 48 jest, że obie rodziny konformacyjne peptydu (10) wiążą się w podobnym regionie, co białko PD-1. W tym miejscu chciałbym jedynie kolokwialnie dopytać, czy w trakcie dokowania pozwolono peptydom wiązać się dowolnym obszarem na białku PD-L1, czy może w jakiś sposób ta powierzchnia była zawężona?
5. Rycina 65 przedstawia bardzo zgrabnie charakterystykę stosowanego modelu komórkowego. Niestety w przypadku tej figury brak jest danych o liczbie powtórzeń i obliczeń statystycznych. Czy ten eksperyment został wykonany jednokrotnie? Czy widoczna różnica pomiędzy fluorescencją komórek kontrolnych i właściwych (*Reporter Ctrl* i *Reporter PD-1*) poddanych działaniu komórek TCS CD86 Ctrl (jasnoszare słupki) jest powtarzalna?
6. Jak wskazano na stronie 123 deglikozylowane białko PD-1 oddziałuje silniej z białkiem PD-L1 niż wersja glikozylowana. Czy zatem wprowadzając glikozylację białek PD-1 i PD-L1 natura celowo osłabia ich oddziaływanie?
7. Na koniec jedno ogólne pytanie z prośbą o opinię i dyskusję. W pracy podjęto się projektowania peptydów wiążących się do białka PD-1 albo PD-L1 bazując na strukturach i sekwencjach ich białkowych partnerów. Jak wskazano w pracy oddziaływanie pomiędzy białkami należy do raczej słabych oddziaływań. Czy zatem bazując na podejściu, w którym naśladujemy ligand słabo wiążący się do

celu molekularnego nie zostajemy skazani na odkrywanie ligandów wykazujących równie słabe oddziaływanie?

Podsumowując uważam, że recenzowana rozprawa prezentuje wysoki poziom badań, zawiera elementy nowości naukowej i wskazuje na dojrzałość naukową Autorki w zakresie wymaganym do uzyskania stopnia naukowego doktora. Na podkreślenie zasługuje różnorodność technik stosowanych własnoręcznie przez Doktorantkę, umiejętność i gotowość do współpracy z doświadczonymi naukowcami, przeprowadzanie koniecznych standaryzacji metod i powtórzeń biologicznych w wykonywanych oznaczeniach, jak również wnikliwość analizy danych. Większość uwag zawartych w niniejszej recenzji należy traktować jako zaproszenie do dyskusji w trakcie obrony doktorskiej.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia wymogi formalne i zwyczajowe stawiane pracom doktorskim i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Anny Bojko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.