



Prof. Jacek Otlewski

Wrocław, 31 sierpnia 2017 r.

Ocena pracy doktorskiej mgr. Krzysztofa M. Żaka zatytułowanej „Structural studies on the interaction of the human PD-1/PD-L1 immune receptor complex and its inhibitors”

Blokowanie oddziaływań makrocząsteczek, najczęściej tworzących kompleks typu białko-białko, z zastosowaniem przeciwciał lub związków niskocząsteczkowych stało się jednym z najbardziej obiecujących sposobów leczenia szeregu chorób, w tym chorób nowotworowych. Proces poszukiwania niskocząsteczkowych antagonistów oddziaływania białko-białko jest jednak żmudny i przebiega stosunkowo wolno, mimo przeznaczania przez koncerny farmaceutyczne ogromnych nakładów finansowych.

Prof. Holak i jego zespół posiadają wieloletnie doświadczenie w określaniu struktur przestrzennych białek metodą krystalografii lub magnetycznego rezonansu jądrowego oraz w poszukiwaniu antagonistów oddziaływań białko-białko, szczególnie kompleksu p53-Mdm2/MdmX, ale także wielu innych oddziaływań białkowych. Praca doktorska mgr. Krzysztofa Żaka, zrealizowana w grupie prof. Holaka podejmuje nowe wezwanie w postaci określenia struktury krystalicznej kompleksu pomiędzy receptorem programowanej śmierci PD-1 a jego ligandem PD-L1 oraz poszukiwania antagonistów tego oddziaływania. Kompleks białek PD-1 i PD-L1 odpowiada za zahamowanie proliferacji limfocytów T, wydzielanie cytokin oraz funkcji cytotoksycznych limfocytów, a jego zablokowanie z użyciem przeciwciał stanowi skuteczną metodę terapii przeciwnowotworowej. Wyniki stosowania monoklonalnych przeciwciał są zaskakująco obiecujące w leczeniu kilku typów nowotworów. Poszukiwanie związków niskocząsteczkowych prowadzących do dysocjacji tego kompleksu, jako kolejnej metody, wydaje się w pełni uzasadnione.

Praca doktorska mgr. Krzysztofa Żaka to napisany po angielsku maszynopis liczący 105 stron, podzielony na rozdziały *Introduction, Results, Discussion, Materials and methods*. Doktorat zawiera

także liczne podziękowania, listę ośmiu publikacji doktoranta, streszczenie w językach polskim i angielskim, cel pracy, listę skrótów i symboli, spis cytowanej literatury oraz kilka dodatków (sekwencje białek, chromatogramy standardów białek oraz informację o wcześniejszej pracy doktoranta nad inhibitorami oddziaływania p53-Mdm2/MdmX). Doktorat napisany jest jasno, poprawną angielszczyzną, w sposób typowy dla publikacji czy doktoratów z nauk biologicznych.

Wstęp podzielony jest na dwie zasadnicze części. W pierwszej z nich doktorant omawia biologię związków pomiędzy układem immunologicznym a komórkami nowotworowymi oraz przedstawia cele molekularne, jakimi są białka PD-1, PD-L1 i CTLA-4. Druga część Wstępu dotyczy omówieniu dostępnych struktur przestrzennych wolnych białek PD-1 i PD-L1/L2 ich kompleksów oraz kompleksów tych białek z przeciwciałami. Wstęp kończy się omówieniem nielicznych przykładów kilku klas związków niskocząsteczkowych zdolnych do rozdysocjowania omawianego kompleksu. Stosunkowo wolny postęp w generowaniu antagonistów tego oddziaływania wynika z braku informacji strukturalnej dotyczącej kompleksu ludzkich białek PD-1 – PD-L1, w szczególności danych o powierzchniach kontaktu obu białek, co stało się głównym celem ocenianego doktoratu.

Omówienie uzyskanych przez doktoranta wyników liczy 48 stron. Najważniejszym osiągnięciem mgr. Żaka jest bez wątpienia rozwiązanie struktury krystalicznej kompleksu ludzkich białek PD-1 i PD-L1 zastosowaniem metody podstawienia cząsteczkowego. Rozwiązanie struktury poprzedziło klonowanie odpowiednich genów do wektorów ekspresyjnych, nadprodukcja białek w systemie bakteryjnym, zwinięcie białek oraz ich oczyszczenie. Poprawność zwinięcia białek została potwierdzona protonowymi widmami jednowymiarowymi oraz widmami HSQC ^1H - ^{15}N NMR. Istotną informacją, jaką uzyskał doktorant analizując strukturę kompleksu są zmiany konformacyjne zachodzące w wyniku oddziaływania białek, a dotyczące rearanżacji powierzchni receptora PD-1, czego nie można oczywiście było przewidzieć ze struktury tego białka w stanie wolnym. Rozwiązanie struktury ludzkiego kompleksu PD-1/PD-L1 uważam za poważne osiągnięcie, które posiada dodatkowo walor aplikacyjny. Z pewnością pomoże projektować niskocząsteczkowe związki, będące antagonistami oddziaływania, co może być niezwykle istotne przy wprowadzaniu skutecznych związków przeciwnowotworowych. W opracowywaniu takich związków pomocna

będzie również struktura krystaliczna wolnej domeny PD-L1 biorąca udział w oddziaływaniu z PD-1, która także została rozwiązana przez doktoranta.

Uzyskane dane strukturalne w dalszej części badań doktoranta zostały wykorzystane do poszukiwania związków, które zdolne byłyby do blokowania omawianego oddziaływania. Badania przesiewowe przeprowadził mgr Żak na bibliotece związków mającej naśladować oddziaływanie reszty Tyr 123 z kieszenią Gly124 receptora PD-1. Niestety badania te nie przyniosły pozytywnych wyników, co może wynikać z ograniczonego rozmiaru biblioteki. Kolejna biblioteka, obejmująca 1500 różnych związków, dostarczyła pozytywnych wyników, gdyż znaleziono szereg związków zdolnych do oddziaływania z PD-1 w milimolowym zakresie ich stężeń. Wartościowy wynik uzyskał także doktorant przesiewając bibliotekę związków wobec PD-L1, odkrywając związek, który wiąże się stosunkowo silnie z białkiem PD-L1. W dalszej części badań, na podstawie opatentowanych związków chemicznych firmy Bristol-Myers Squib (związki BMS), doktorant ustalił, stosując miareczkowanie z użyciem NMR, że cząsteczki te oddziałują z białkiem PD-L1. Rozwiązanie sześciu struktur krystalicznych związków BMS z białkiem PD-L1 pomogło lepiej zdefiniować obszar na powierzchni białka PD-L1, który mógłby służyć jako miejsce oddziaływania z antagonistami. Jest to drugi bardzo wartościowy wynik osiągnięty w ramach tego doktoratu.

Nie mam istotnych uwag odnośnie ocenianej rozprawy doktorskiej.

Drobny komentarz:

- str. 42: „...involve mostly hydrophobic and polar interactions.” Jakiego typu mogą być w takim razie jeszcze inne oddziaływania?

W podsumowaniu, jest to bardzo dobry doktorat z obszaru biologii strukturalnej. Praca jest dobrze napisana i zilustrowana, a wyniki są prawidłowo przedyskutowane. Doktorant jest współautorem dziewięciu publikacji, przy czym w pięciu z nich jest pierwszym autorem. Ze względu na wysoką wartość naukową doktoratu, związaną przede wszystkim z określeniem struktury krystalicznej kompleksu ludzkich białek pD-1/PD-L,1 wnioskuję do Rady Wydziału o wyróżnienie tego doktoratu.

We wniosku końcowym stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr. Krzysztofa M. Żaka zatytułowana, "Structural studies on the interaction of the human PD-1/PD-L1 immune receptor complex and its inhibitors," spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim, a ujęte stosownymi przepisami. Wnoszę do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr. Żaka do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'K. Żak', is located below the main text. The signature is fluid and cursive, with a prominent upward stroke at the end.