

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Kamila Przytulskiego**  
**pt. „Structure Based Drug Design for the Rational Development of Degraders against**  
**Protein Kinase C - Theta”**  
**wykonanej w Grupie Badawczej Maxa Plancka**  
**Małopolskiego Centrum Biotechnologii**  
**Uniwersytetu Jagiellońskiego**  
**Pod opieką naukową dr hab. Sebastiana Glatta**

**1. Tematyka rozprawy**

Spośród wielu białek związanych ze stanami patologicznymi POI (z ang. Protein of Interest) jedynie niewielka ich część (głównie enzymy) na tą chwilę może być skutecznie hamowana z użyciem konwencjonalnych leków (głównie inhibitorów). Znaczna większość nieenzymatycznych POI pozostaje obecnie poza zasięgiem medycyny molekularnej i wymaga opracowania nowatorskich strategii umożliwiających ich inaktywację. W ostatnich kilkunastu latach opracowano podejście ukierunkowanej degradacji białek TPD (z ang. Targeted Protein Degradation), w którym aktywowane są naturalne komórkowe mechanizmy degradacji białek celem selektywnej eliminacji pojedynczego POI. Obecnie w skład TPD wchodzi szereg mechanizmów, które skierowują POI głównie na szlak degradacji proteasomalnej lub na ścieżkę autofagii. TPD jest niezwykle intensywnie rozwijającą się gałęzią nauk biologicznych i biotechnologii medycynej i stanowi nadzieję na opracowanie leków na nieuleczalne do tej pory choroby. **Niniejsza rozprawa doktorska dotyczy opracowania podejścia TPD celującego w kinazę białkową kluczową w przekazywaniu sygnałów w szeregu typów komórek (przez to mogącego być celem molekularnym w leczeniu chorób autoimmunologicznych oraz nowotworowych). Tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy więc istotnych zagadnień dla rozwoju nauk biologicznych.**

**2. Wiedza kandydata**

Praca doktorska ma klasyczną formę, w której w rozdziale Wstęp Doktorant stopniowo wprowadza czytelnika w tematykę prowadzonych badań, zaczynając od rodziny badanych kinaz, ich budowy oraz mechanizmu aktywacji, przechodząc następnie do specyficznej izoformy badanej kinazy, jej modyfikacji potranslacyjnych, udziału w szlakach sygnalizacyjnych oraz w chorobach. Następnie Doktorant koncentruje się na strategii TPD, w szczególności na podejściach wykorzystujących proteasomy, na klejach molekularnych oraz bifunkcjonalnych degraderach (które stanowią główny





temat pracy). **Część wstępną przedstawiono w sposób zwięzły, ale trafny i merytorycznie poprawny, co świadczy o posiadaniu przez Doktoranta ogólnej wiedzy teoretycznej wymaganej dla osoby ubiegającej się o stopień doktora w dyscyplinie nauki biologiczne.** W mojej opinii zabrakło w tym rozdziale dokładniejszych informacji o istniejących już metodach inhibicji/inaktywacji/degradacji badanego celu molekularnego.

Sekcje: metodyczna oraz wynikowa zostały przedstawiona szczegółowo, co umożliwia potencjalne odtworzenie zastosowanych warunków eksperymentalnych. W tej części zabrakło informacji w jaki sposób syntetyzowane były badane degradery oraz jak testowana była aktywność degraderów w komórkach. Ponieważ jest to istotna część pracy, bardzo prosilibym o omówienie niniejszego punktu w trakcie obrony pracy doktorskiej. **Pomimo tego, że w pracy używane były różnorodne techniki, w tym zaawansowane techniki biofizyczne i biologii strukturalnej, w sekcji Wyniki Doktorant wnikliwie analizuje te dane, co świadczy o posiadaniu przez Doktoranta solidnej specjalistycznej wiedzy metodycznej wymaganej dla osoby ubiegającej się o stopień doktora w dyscyplinie nauki biologiczne.**

W rozdziale Dyskusja Doktorant bardzo zwięzłe, choć merytorycznie poprawnie osadził uzyskane wyniki w szerszym kontekście zastanego stanu wiedzy w polu badawczym. W części tej zabrakło mi dokładniejszego przedyskutowania efektu dodanego uzyskanych wyników oraz perspektyw na przyszłość.

**Podsumowując, wnikliwa analiza poszczególnych części pracy doktorskiej pozwala stwierdzić, że niniejsza rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną wymaganą do nadania stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne.**

### 3. Samodzielność kandydata

Praca doktorska została wykonana w ramach programu Doktorat Wdrożeniowy pod opieką naukową dr hab. Sebastiana Glatta, we współpracy z firmą Captor Therapeutics SA. Zarówno dokonała grupa Maxa Plancka MCB UJ i światowej klasy ekspertyza w biochemii i biologii strukturalnej prof. Glatta jak i doświadczenie firmy Captor Therapeutics, opracowującej różnego rodzaju degradery w ramach TPD stanowiły doskonałe zaplecze naukowe do przygotowania niniejszej pracy doktorskiej oraz dostarczyły wszechstronnego wsparcia eksperckiego dla Doktoranta na każdym etapie realizacji projektu doktorskiego.

Doktorant opracował warunki produkcji i oczyszczania celu molekularnego i jego mutacyjnych wariantów, zbadał oddziaływanie białka z kilkoma degraderami przygotowanymi przez Captor Therapeutics, przeprowadził testy krystalizacji celu molekularnego z kilkoma degraderami i rozwiązał



struktury kompleksów badanego białka z badanymi związkami. W pracy wykazano także, że opracowane związki są w stanie obniżyć komórkowy poziom badanej kinazy. **Odpowiednie planowanie badań, ich przekrojowość, zastosowanie różnorodnych technik biofizycznych i biochemicznych niezbędnych do rozwiązania zadanego problemu naukowego, poprawna interpretacja danych świadczą o umiejętności samodzielnego prowadzenia badań przez Doktoranta, na poziomie wymaganym od osób ubiegających się o nadanie stopnia doktora.** Ponieważ w części metodycznej nie znalazłem odniesienia do eksperymentów degradacji celu molekularnego w komórkach Jurkat, bardzo prosiłbym o uściślenie w trakcie obrony czy eksperymenty wykazane na rycinie 3.28C zostały wykonane przez Doktoranta.

#### 4. Oryginalność rozprawy

Praca doktorska miała na celu przyczynienie się do opracowania nowatorskiej cząsteczki opartej o znany inhibitor badanego celu molekularnego, indukującej degradację tego enzymu. Cel ten miano osiągnąć poprzez poznanie struktury badanego białka w kompleksie z wytypowanymi wyjściowymi degraderami oraz wykorzystanie uzyskanej wiedzy celem optymalizacji degradera. Wyjściowo podjęto próbę uzyskania celu molekularnego w komórkach bakteryjnych, z czego jednak zrezygnowano ze względu na występowanie białka w rozpuszczalnych agregatach, co utrudniało analizy strukturalne. Następnie z sukcesem wyprodukowano cel molekularny i mutanty tego białka w komórkach owadzych, przeprowadzono biofizyczne testy stabilności uzyskanych białek oraz ich oddziaływania z wybranymi degraderami. Rozwiązano struktury krystaliczne celu molekularnego w kompleksie z degraderami i wykorzystano uzyskaną wiedzę do dalszych modyfikacji struktury degradera, celem zwiększenia jego powinowactwa względem celu. Uzyskane dane pozwoliłyby też na sformułowanie hipotezy mogącej tłumaczyć selektywność wybranych inhibitorów/degraderów względem poszczególnych izoform badanych kinaz. O ile istnieje wiele raportów literaturowych dotyczących otrzymywania rekombinowanych wariantów celu molekularnego oraz opublikowano kilka struktur tego białka w bazach danych, to **rozwiązanie struktury badanego białka w kompleksie z selektywnymi degraderami stanowi w pełni oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.** Dzięki poznaniu architektury molekularnej badanego białka ze związanymi degraderami możliwe było zaproponowanie modyfikacji chemicznych degradera. Finalnie, przedstawione w pracy doktorskiej wyniki przyczyniły się do opracowania degraderów dla celu molekularnego, które wykazują pożądaną aktywność w modelowych komórkach Jurkat (wydajnie obniżają poziom białka) oraz wykazują selektywność względem wybranej izoformy. **Uzyskanie wyniki mogą się przyczynić do wyłonienia kandydatów na leki celujące w badaną kinazę opracowywane w Captor Therapeutics, stanowiąc przez to**

**przykład na potencjalne zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej.**

**5. Pytania i/lub uwagi krytyczne, na które Recenzent oczekuje odpowiedzi kandydata w czasie obrony**

Bardzo prosiłbym Doktoranta o ustosunkowanie się do poniższych kwestii w trakcie obrony pracy doktorskiej:

- W świetle doniesień literaturowych, sugerujących istotną przewagę systemu eukariotycznego w produkcji celu molekularnego (ryc. 3.9), zaskakujące było rozpoczęcie badań od próby produkcji białka w systemie bakteryjnym? Jaka była przyczyna takiej decyzji? Czym różniły się warunki uzyskania białka w bakteriach, które pozwoliły opracować strukturę krystaliczną celu molekularnego od warunków użytych przez Doktoranta?
- Czy w trakcie oczyszczania rekombinowanego białka analizowano tożsamość izolowanego białka (np. przez western blotting, lub spektrometrię mas)?
- Czy próbowano produkować cel molekularny w bakteriach w obecności inhibitora PKC? Czy w testach wzrostu wykonano pełne krzywe wzrostu, czy jedynie pomiar punktowy?
- Czy w testach fosforylacji celu molekularnego, gdzie wykryto nieznaczące różnice w poziomie pSer696 (Ryc. 3.12C) przygotowano kontrolę ładowania (np. całkowite białko CBB oraz detekcję całkowitego poziomu celu przeciwciałem anti- cel)?
- W Tabeli 7 i 9 przedstawiono parametry oddziaływania degraderów z białkiem. Co znaczy  $n=7$  (Tabela 7)  $n=2$  (tabela 9) w tych przypadkach (niezależne pomiary na różnych izolacjach białka)? Dlaczego SEM pojawia się tylko przy jednym degraderze (Tabela 7) (czy inne degradery były zmierzone tylko raz)? Czy przeprowadzono statystyczne testy istotności obserwowanych różnic? Podobnie, w Tabeli 10 przedstawiono wybrane parametry degraderów.



Jakie było n w tych eksperymentach? Czy analizowano istotność statystyczną obserwowanych różnic?

- Czy w testach przedstawionych na Rys. 3.28 badano wyjściowy ligand, który posłużył jako baza do produkcji degraderów? Czy wykazano, że spadek poziomu celu molekularnego wynika z degradacji proteasomalnej pod wpływem degradera, a nie z jakiegoś innego zjawiska?

#### 6. Inne spostrzeżenia dotyczące treści lub formy rozprawy

Praca została przygotowana w języku angielskim, jest staranna i posiada odpowiednie rozdziały. Pod kątem technicznym zasugerowałbym na przyszłość wyodrębnienie Celu pracy ze Wstępu do osobnego rozdziału i dodanie go do spisu treści. W obecnej formie Cel pracy jest bardzo słabo widoczny. Uważam też, że rozdział 3.2.1 bardziej nadaje się do Wstępu lub Dyskusji niż do sekcji Wyniki.

#### 7. Ocena końcowa

Podsumowując, przedstawioną do recenzji pracę doktorską mgr Kamila Przytułskiego oceniam jako naukowo ciekawą i dotyczącą istotnej tematyki dla zdrowia człowieka, mającą oprócz znaczenia poznawczego także charakter potencjalnie aplikacyjny. **Chciałbym w związku z tym serdecznie pogratulować zarówno Doktorantowi jak i Promotorowi.**

W związku z tym, ja niżej podpisany stwierdzam, że recenzowana praca doktorska mgr **Kamila Przytułskiego** spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1688 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o





dopuszczenie **mgr Kamila Przytulskiego** do dalszych etapów postępowania ws. Nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Zakład Biotechnologii Medycznej  
KIEROWNIK

prof. dr hab. Łukasz Opaliński

Prof. dr hab. Łukasz Opaliński