



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

prof. dr hab. inż. Jacek Czub
Katedra Chemii Fizycznej
Politechnika Gdańska
ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk
tel. +48 535970599
e-mail: jacek.czub@pg.edu.pl

Gdańsk, 25.06.2026

RECENZJA

rozprawy doktorskiej pana mgr. inż. Piotra Ciury pt. „Blokowanie oddziaływań wybranych punktów kontrolnych przy wykorzystaniu peptydów – innowacyjne podejście do immunosupresji”.

Przedmiotem niniejszej recenzji jest rozprawa doktorska pana mgr. inż. Piotra Ciury pt. „Blokowanie oddziaływań wybranych punktów kontrolnych przy wykorzystaniu peptydów -- innowacyjne podejście do immunosupresji”, przygotowana pod opieką dr. hab. Adama Kazimierza Sieradzana, prof. UG, oraz promotora pomocniczego dr hab. Marty Spodziei. Praca poświęcona jest racjonalnemu projektowaniu, otrzymywaniu oraz doświadczalnej weryfikacji peptydowych związków zdolnych do zaburzania tworzenia kompleksu HVEM/LIGHT, ważnego elementu sieci regulacyjnej punktów kontrolnych układu odpornościowego. Głównym celem badań było wskazanie i wstępne scharakteryzowanie peptydów, które poprzez oddziaływanie z HVEM lub LIGHT mogłyby ograniczać powstawanie tego kompleksu i w przyszłości stanowić punkt wyjścia do dalszej optymalizacji nowych narzędzi immunomodulacyjnych.

Realizacja tego celu wymagała połączenia kilku odmiennych obszarów badawczych. Doktorant wykorzystał metody modelowania molekularnego, w tym symulacje dynamiki molekularnej, analizy MM-GBSA oraz sterowaną dynamikę molekularną, a następnie zestawiał uzyskane predykcje z syntezą peptydów, ich charakterystyką fizykochemiczną oraz badaniami biochemicznymi i komórkowymi. Tak szeroki zakres pracy dobrze pokazuje interdyscyplinarny charakter rozprawy, a zarazem świadczy o dużym zaangażowaniu, wszechstronności i pracowitości Doktoranta oraz o jego umiejętności łączenia narzędzi chemii obliczeniowej, chemii peptydów i immunologii eksperymentalnej.

Tematyka rozprawy jest istotna zarówno poznawczo, jak i potencjalnie aplikacyjnie. Zaburzenia regulacji odpowiedzi immunologicznej, w tym nadmierna aktywacja limfocytów T, odgrywają ważną rolę w chorobach autoimmunologicznych oraz powikłaniach immunologicznych obserwowanych w transplantologii, co nadaje podjętym badaniom wyraźny kontekst społeczny i medyczny. W tym ujęciu praca stanowi interesujący przykład racjonalnego wykorzystania metod obliczeniowych do projektowania peptydów o pożądanych właściwościach wiążących i inhibicyjnych, a następnie ich weryfikacji w układach eksperymentalnych. Cel badań został dobrze zdefiniowany i konsekwentnie zrealizowany. Uzyskane peptydy stanowią obiecujące związki wiodące, które po dalszej optymalizacji strukturalnej, farmakokinetycznej i funkcjonalnej mogłyby stać się podstawą do rozwijania nowych narzędzi immunomodulacyjnych.

Zasadnicza część rozprawy ma charakter opracowania cyklu trzech spójnych publikacji naukowych, opatrzonych wspólnym wstępem, opisem metod oraz syntetycznym omówieniem najważniejszych wyników. Warto podkreślić, że Doktorant jest pierwszym autorem wszystkich trzech prac wchodzących w skład cyklu, a dołączone oświadczenia współautorów potwierdzają jego kluczowy udział zarówno w planowaniu i realizacji badań, jak i w analizie oraz interpretacji uzyskanych wyników. Taka forma jest w pełni uzasadniona, ponieważ poszczególne prace tworzą logiczny ciąg badawczy: od obliczeniowego rozpoznania interfejsu HVEM/LIGHT i zaprojektowania pierwszej serii peptydów, przez ich syntezę i walidację eksperymentalną, po rozszerzenie strategii na peptydy wywodzące się z białka LIGHT. Z przedstawionego materiału wynika, że mgr inż. Piotr Ciura odegrał istotną rolę w realizacji zarówno części obliczeniowej, jak i eksperymentalnej rozprawy, a uzyskane wyniki są efektem znaczącego nakładu pracy.

W części wprowadzającej Doktorant omawia podstawowe zagadnienia dotyczące budowy i funkcjonowania układu odpornościowego, aktywacji limfocytów T oraz roli punktów kontrolnych w regulacji odpowiedzi immunologicznej. Następnie przechodzi do bardziej szczegółowego opisu białek HVEM i LIGHT, struktury tworzonego przez nie kompleksu oraz potencjalnego znaczenia tej interakcji w chorobach autoimmunologicznych i immunosupresji. Wprowadzenie dobrze spełnia swoją rolę: jako osoba niebędąca specjalistą w immunologii uznałem je za pomocne, logicznie uporządkowane i wystarczające do zrozumienia biologicznego kontekstu dalszych badań. Na szczególne podkreślenie zasługuje to, że Autor pokazuje, iż modulowanie sygnalizacji zależnej od LIGHT ma solidne podstawy w literaturze, a wcześniejsze podejścia oparte na białkach fuzyjnych oraz przeciwciałach dobrze przygotowują grunt pod tezę, że peptydy mogą być rozważane jako alternatywna, łatwiejsza do modyfikacji klasa inhibitorów oddziaływań białko-białko.

Lektura wstępu nasunęła mi jedynie kilka uwag doprecyzowujących. Po pierwsze, warto byłoby wyraźniej rozróżnić selektywne blokowanie kompleksu HVEM/LIGHT od szerszej neutralizacji LIGHT jako liganda kilku receptorów. Wiele wcześniejszych strategii, takich jak białka fuzyjne czy przeciwciała anty-LIGHT, może równocześnie zaburzać także inne interakcje LIGHT, zwłaszcza LT β R/LIGHT. Autor podejmuje ten problem w dalszej części pracy, przy omawianiu selektywności peptydów, jednak wcześniejsze zaznaczenie tej kwestii ułatwiłoby lekturę. Po drugie, Doktorant dość mocno przeciwstawia peptydy przeciwciałom. Oczywiście peptydy mają wiele zalet, takich jak mniejszy rozmiar, łatwość syntezy i możliwość modyfikacji, jednak w przypadku rozpoznawania rozległych powierzchni białkowych przewagę przeciwciał może stanowić ich stabilna, dobrze zdefiniowana struktura oraz precyzyjnie uformowana powierzchnia wiążąca. Krótkie peptydy są zwykle bardziej elastyczne i częściowo nieuporządkowane, co może utrudniać uzyskanie wysokiej selektywności i zwiększać ryzyko oddziaływań niespecyficznych. Warto też zauważyć, że mimo bardzo dynamicznego rozwoju leków peptydowych, w tym ostatnio analogów GLP-1, przeciwciała monoklonalne pozostają stale najliczniejszą grupą leków biologicznych.

Opis metod zastosowanych w rozprawie jest zasadniczo poprawny i pozwala zrozumieć zarówno strategię obliczeniową, jak i przebieg części eksperymentalnej. Autor omawia protokoły dynamiki molekularnej, analiz energetycznych oraz sterowanej dynamiki molekularnej, a także metody syntezy, oczyszczania i charakterystyki peptydów oraz testy służące ocenie ich powinowactwa, aktywności inhibicyjnej i zachowania w układach komórkowych. Dobór metod jest adekwatny do postawionych celów

pracy. Szczególnie pozytywnie oceniam połączenie testów biochemicznych z testami komórkowymi, ponieważ pozwala ono sprawdzić, czy obserwowane wiązanie peptydów do celu molekularnego przekłada się również na efekt funkcjonalny w bardziej złożonym układzie biologicznym.

Mam jednak kilka pytań i uwag dotyczących części metodologicznej. Pierwsza dotyczy wyboru fragmentów trajektorii wykorzystywanych do dalszych analiz. W kilku miejscach analizy oparto na końcowych 20 ns trajektorii. Taki wybór może być uzasadniony, jeśli analizowane wielkości są już ustabilizowane, a ich czasy autokorelacji są znacząco krótsze niż długość analizowanego okna czasowego. W przypadku elastycznych kompleksów białko-peptyd, a zwłaszcza krótkich peptydów częściowo nieuporządkowanych, nie jest to jednak oczywiste. Klatki pobierane z końcowych 20 ns mogą być istotnie skorelowane, a obserwowane wielkości, takie jak liczba kontaktów, energia oddziaływania, promień bezwładności czy konformacja peptydu, mogą zmieniać się w skalach czasowych porównywalnych lub dłuższych. Interesowałoby mnie zatem, czy wybór tego okna wynikał z analizy zbieżności, czy raczej z kompromisu pomiędzy kosztem obliczeniowym a potrzebą ujednolicenia protokołu dla dużej liczby układów.

Podobna uwaga dotyczy wkładu entropowego wyznaczanego metodą analizy modów normalnych. Entropię obliczano dla niewielkiej liczby struktur z końcowych fragmentów trajektorii, co jest praktyką spotykaną w MM-GBSA ze względu na koszt NMA, ale w przypadku elastycznych, częściowo nieustrukturyzowanych peptydów może nie opisywać dobrze pełnej entropii konformacyjnej. Jest to istotne, ponieważ wyniki CD i NMR sugerują, że część peptydów jest w roztworze silnie nieuporządkowana, a ich wiązanie może wiązać się ze znacznym kosztem entropowym. Chciałbym zapytać, czy Doktorant rozważał podejście quasi-harmoniczne, oparte na PCA dłuższego fragmentu trajektorii, które mimo własnych ograniczeń mogłoby lepiej uchwycić różnorodność konformacyjną wolnych peptydów i jej ograniczenie po utworzeniu kompleksu.

W części eksperymentalnej zainteresowała mnie kwestia potwierdzenia prawidłowego parowania cystein w peptydach zawierających mostki disulfidowe. Zgodność mas cząsteczkowych potwierdza otrzymanie związków o oczekiwanej masie, ale zwłaszcza przy dwóch mostkach nie musi jednoznacznie potwierdzać ich topologii. Byłbym ciekaw, czy poprawność parowania cystein była dodatkowo weryfikowana, np. metodami MS/MS, mapowania mostków lub analizą NMR.

Pierwsza publikacja wchodząca w skład rozprawy ma przede wszystkim charakter obliczeniowy i stanowi punkt wyjścia do dalszych badań eksperymentalnych. Doktorant wraz ze współautorami przeanalizował strukturę kompleksu HVEM/LIGHT, a następnie zaprojektował szeroką serię peptydów opartych na fragmentach domen CRD białka HVEM. Badane warianty różniły się długością, obecnością i rozmieszczeniem mostków disulfidowych oraz wybranymi substytucjami reszt aminokwasowych. Zastosowanie symulacji dynamiki molekularnej, analiz MM-GBSA, sterowanej dynamiki molekularnej oraz obliczeń profili energii swobodnej pozwoliło wskazać domenę CRD2 jako kluczowy fragment interfejsu HVEM/LIGHT oraz wytypować najbardziej obiecujące peptydy, w szczególności CRD2e_K54E i skrócony wariant CRD2(39–73)e. Uzupełniające pomiary dichroizmu kołowego potwierdziły znaczną elastyczność i częściowo nieuporządkowany charakter wybranych peptydów w roztworze. Praca ta dostarczyła więc

racjonalnych podstaw do wyboru kandydatów przeznaczonych do syntezy i walidacji eksperymentalnej w kolejnej części rozprawy.

W mojej ocenie praca ta jest zasadniczo poprawna pod względem metodologicznym i dobrze spełnia rolę etapu przesiewowego, pozwalającego zawęzić dużą liczbę możliwych wariantów peptydowych do kilku najbardziej obiecujących kandydatów. Pewne zastrzeżenia budzi natomiast miejscami zbyt mocna interpretacja wyników energetycznych, zwłaszcza gdy wartości uzyskane metodą MM-GBSA, będące w praktyce raczej funkcją scoringową niż ścisłą energią swobodną wiązania, są opisywane językiem sugerującym bezpośrednie przewidywanie powinowactwa. W związku z tym chciałbym zapytać Doktoranta, jak interpretuje rozbieżności pomiędzy rankingiem i wartościami „efektywnych energii” uzyskanych metodą MM-GBSA a znacznie słabszymi energiami swobodnymi wiązania wyznaczonymi metodą umbrella sampling. Interesujące byłoby również odniesienie tych wartości do wyników eksperymentalnych przedstawionych w kolejnej publikacji, gdzie zmierzone powinowactwa wybranych peptydów do LIGHT wskazują na znacznie silniejsze wiązanie niż sugerowałyby wartości ΔG uzyskane z profili PMF.

Druga publikacja stanowi, w mojej ocenie, szczególnie ważną i bardzo udaną część rozprawy, ponieważ przenosi kandydatów wytypowanych obliczeniowo do pełniejszej walidacji eksperymentalnej. Doktorant zsyntetyzował i oczyścił serię peptydów opartych na fragmentach białka HVEM, a następnie ocenił ich powinowactwo do LIGHT, zdolność do hamowania tworzenia kompleksu HVEM/LIGHT oraz zachowanie w układach komórkowych. Szczególnie wartościowe jest tu zastosowanie kilku komplementarnych poziomów weryfikacji: pomiarów powinowactwa, testów ELISA, oceny stabilności i cytotoksyczności oraz eksperymentu komórkowego opartego na aktywacji szlaku NF- κ B i ekspresji eGFP. Ten ostatni eksperyment uważam za bardzo elegancki, ponieważ pozwala sprawdzić, czy efekt obserwowany w układzie oczyszczonych białek przekłada się również na bardziej złożony model biologiczny. Ważnym elementem pracy jest także próba oceny selektywności badanych peptydów, w szczególności ich wpływu na interakcje BTLA/HVEM oraz LT β R/LIGHT.

Wyniki tej publikacji przekonująco pokazują, że spośród badanych związków szczególnie interesujące właściwości wykazują peptydy CRD2e_K54E oraz CRD2(39–73)e. Uzyskane dane dobrze potwierdzają ogólną zasadność wcześniejszego etapu obliczeniowego: peptydy wytypowane jako najbardziej obiecujące rzeczywiście wiążą LIGHT i częściowo hamują tworzenie kompleksu HVEM/LIGHT. Warto przy tym podkreślić, że Autor zachowuje tu właściwą ostrożność interpretacyjną, traktując otrzymane związki raczej jako struktury wiodące niż jako gotowe inhibitory o pełnej skuteczności biologicznej.

Sam opis publikacji w rozprawie jest poprawny i zrozumiały, choć miejscami ma charakter dość raportowy. W mojej ocenie czytelnikowi pomogłoby nieco bardziej narracyjne prowadzenie przez kolejne doświadczenia, na przykład przez krótkie wskazanie, dlaczego po pomiarach powinowactwa konieczne było wykonanie testów inhibicji etc.

W odniesieniu do tej pracy chciałbym sformułować jedno pytanie. Najlepsze peptydy wykazują mierzalne, a w niektórych przypadkach bardzo dobre powinowactwo do LIGHT, natomiast ich inhibicja kompleksu HVEM/LIGHT pozostaje częściowa. Jest to zrozumiałe, ponieważ pełne białko HVEM tworzy z LIGHT znacznie rozleglejszą powierzchnię kontaktu niż krótki peptyd obejmujący jedynie najważniejszy fragment interfejsu. Interesowałoby mnie jednak, jak Doktorant widzi dalszą optymalizację takich inhibitorów: czy bardziej obiecujące byłoby dalsze wzmacnianie powinowactwa i stabilizacji obecnego

krótkiego fragmentu, czy raczej projektowanie większych lub wielowartościowych mimetyków, które lepiej odtwarzałyby szerszą powierzchnię oddziaływania HVEM z LIGHT?

Trzecia publikacja stanowi logiczne rozwinięcie poprzednich prac, ponieważ odwraca strategię projektowania i koncentruje się na peptydach wywodzących się z białka LIGHT, a więc potencjalnych inhibitorach wiążących się do HVEM. Autor ponownie łączy modelowanie molekularne z walidacją eksperymentalną, obejmującą pomiary powinowactwa, testy inhibicji tworzenia kompleksu HVEM/LIGHT, ocenę stabilności i cytotoksyczności oraz test komórkowy oparty na aktywacji NF- κ B i ekspresji eGFP. Wyniki wskazały peptydy light3 i light3_E178L jako najbardziej obiecujące struktury wiodące. Praca jest spójna z całą koncepcją rozprawy i pokazuje alternatywny kierunek projektowania inhibitorów kompleksu HVEM/LIGHT.

W odniesieniu do tej pracy chciałbym zapytać o interpretację umiarkowanego efektu inhibicyjnego w teście komórkowym. Czy Doktorant wiąże go przede wszystkim z geometrią i wielowartościowością oddziaływania HVEM z błonowym LIGHT, z tym, że peptyd blokuje tylko fragment powierzchni kontaktowej, czy również z protokołem eksperymentu, w którym po preinkubacji odmywany jest niezwiązany peptyd? Interesuje mnie także, czy rozważano wariant testu prowadzony w bardziej równowagowych warunkach, przy stałej obecności określonego stężenia peptydu, który pozwoliłby oddzielić wpływ powinowactwa równowagowego od kinetyki dysocjacji, czyli off-rate kompleksu peptyd-HVEM.

Na poziomie metodologicznym i technicznym rozprawa bardzo dobrze świadczy o opanowaniu warsztatu naukowego przez Doktoranta. Mgr inż. Piotr Ciura swobodnie porusza się zarówno w obszarze modelowania molekularnego, jak i w szerokim zakresie metod eksperymentalnych, obejmujących syntezę i charakterystykę peptydów, pomiary powinowactwa, testy inhibicji oraz badania komórkowe. Szczególnie pozytywnie oceniam umiejętne połączenie tych dwóch perspektyw: obliczenia nie są tu celem samym w sobie, lecz służą projektowaniu konkretnych kandydatów, których właściwości są następnie weryfikowane doświadczalnie. Taka konstrukcja pracy pokazuje dojrzałość badawczą Doktoranta i jego zdolność do prowadzenia badań na styku kilku specjalistycznych obszarów.

Rozprawa została napisana starannym i zasadniczo poprawnym językiem naukowym, a jej układ pozwala zwykle dobrze śledzić logikę przeprowadzonych badań. Autor swobodnie posługuje się terminologią z zakresu immunologii, chemii peptydów, biofizyki molekularnej i modelowania komputerowego. W trakcie lektury zwróciłem jednak uwagę na kilka drobnych nieścisłości językowych, terminologicznych i metodologicznych, a także na kilka miejsc, które mogłyby zostać doprecyzowane. Uwagi te nie wpływają istotnie na moją pozytywną ocenę rozprawy, lecz ich wyjaśnienie lub korekta mogłyby zwiększyć precyzję przekazu.

Do mniej istotnych uwag i pytań szczegółowych zaliczyłbym następujące kwestie:

– W rozdziale 5.5 przeciwciała anty-OX40, takie jak MEDI6469, MEDI0562 czy MOXR0916, zostały przedstawione jako cząsteczki hamujące tworzenie kompleksu OX40/OX40L. W literaturze są one jednak zwykle opisywane jako przeciwciała agonistyczne, wzmacniające sygnalizację przez OX40, dlatego ten fragment wymagałby doprecyzowania.

– W opisie symulacji układy neutralizowano jonami Na^+ lub Cl^- , ale nie znalazłem uzasadnienia rezygnacji z dodatku soli odpowiadającej fizjologicznej sile jonowej. Czy w analizach MM-GBSA parametr siły jonowej ustawiono konsekwentnie zgodnie z warunkami symulacji, czy też przyjęto standardową wartość 0,15 M.

– W części metod eksperymentalnych podane stężenie NaCl w PBS jako 0,437 M wydaje się nietypowo wysokie i najprawdopodobniej jest literówką; standardowy PBS zawiera zwykle około 0,137 M NaCl.

– Sformułowanie „z modelem uogólnionego Borna” lepiej zastąpić określeniem „z uogólnionym modelem Borna”.

– Określenie „analiza modułów normalnych” powinno zostać zastąpione standardowym terminem „analiza modów normalnych” lub „analiza drgań normalnych”.

– W kilku miejscach pojawia się trochę niefortunne sformułowanie dotyczące „pracy wewnętrznej wykonywanej przez peptyd”. Jeśli chodzi o zmianę energii konformacyjnej peptydu między stanem wolnym i związanym, warto nazwać to wprost jako koszt lub zmianę energii konformacyjnej, ponieważ obecne określenie może być mylące fizycznie.

– Przy omawianiu wyników termoforezy warto konsekwentnie stosować określenie „pozorna (apparent) Kd”, ponieważ badane układy obejmują białka wielowartościowe, więc nie zawsze odpowiadają prostemu modelowi wiązania 1:1.

Konkluzja

Reasumując, przedstawiona rozprawa doktorska stanowi spójne i wartościowe opracowanie poświęcone projektowaniu oraz weryfikacji peptydowych inhibitorów oddziaływania HVEM/LIGHT. Praca została konsekwentnie zrealizowana, łącząc metody modelowania molekularnego z szerokim zakresem technik eksperymentalnych. Taki multidyscyplinarny charakter badań dobrze świadczy o przygotowaniu Doktoranta oraz jego umiejętności prowadzenia prac na styku chemii peptydów, biofizyki molekularnej i immunologii.

Na szczególne podkreślenie zasługuje istotny wkład mgr. inż. Piotra Ciury w powstanie wszystkich trzech publikacji stanowiących podstawę rozprawy, potwierdzony jego pierwszoautorstwem oraz oświadczeniami współautorów. Uzyskane wyniki mają oryginalny charakter i wskazują obiecujące kierunki dalszej optymalizacji peptydowych modulatorów wybranych punktów kontrolnych układu odpornościowego.

W mojej ocenie rozprawa spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w dyscyplinie nauki chemiczne. W związku z powyższym wnoszę o przyjęcie rozprawy doktorskiej pana mgr. inż. Piotra Ciury oraz dopuszczenie go do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoki walor poznawczy i aplikacyjny przedstawionych badań, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Uzasadnienie wniosku o wyróżnienie

Wniosek o wyróżnienie rozprawy uzasadniam przede wszystkim zakresem, kompletnością i konsekwencją zrealizowanego programu badawczego. Doktorant przeprowadził prace obejmujące praktycznie cały proces

rozwoju badanych peptydów: od analizy strukturalnej kompleksu HVEM/LIGHT i racjonalnego projektowania kandydatów, przez ich syntezę, oczyszczanie i charakterystykę, aż po ocenę powinowactwa, aktywności inhibicyjnej, selektywności oraz działania w układach komórkowych. Na każdym z tych etapów konieczne było zastosowanie odmiennych narzędzi badawczych oraz umiejętne powiązanie ich wyników w jedną spójną całość. Realizacja tak szeroko zakrojonego zadania wymagała sprawnego połączenia kompetencji z zakresu modelowania molekularnego, chemii peptydów, biofizyki oddziaływań białko-peptyd oraz metod eksperymentalnych stosowanych w badaniach immunologicznych. W mojej ocenie właśnie ta pełna ścieżka, prowadząca od projektu obliczeniowego do weryfikacji eksperymentalnej, stanowi jedną z najmocniejszych stron rozprawy.

Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że mgr inż. Piotr Ciura jest pierwszym autorem wszystkich trzech publikacji stanowiących podstawę rozprawy. Dołączone oświadczenia współautorów potwierdzają, że jego udział nie miał charakteru pomocniczego, lecz obejmował kluczowe etapy planowania, realizacji, analizy i interpretacji badań. Świadczy to o wysokim stopniu samodzielności naukowej Doktoranta oraz o jego rzeczywistej odpowiedzialności za spójność i powodzenie całego projektu.

Pozytywną ocenę wzmacnia również ogólny dorobek publikacyjny Doktoranta. Poza pracami tworzącymi cykl doktorski jest on współautorem dodatkowych artykułów opublikowanych w prestiżowych czasopismach z zakresu chemii medycznej, co pokazuje, że jego aktywność naukowa wykracza poza jeden wąsko zdefiniowany projekt i dobrze wpisuje się w obszar badań nad związkami o potencjale biologicznym i terapeutycznym.

