

Prof. Piotr Młynarz
Katedra Biochemii,
Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Wydział Chemiczny
Politechnika Wroclawska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

Wrocław, 28.12.2020 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgra Mateusza Adama Krzyścika, zatytułowanej: „Wysoce cytotoksyczne koniugaty oparte o ludzki czynnik wzrostu fibroblastów 2”

Przedstawiona do oceny dysertacja doktorska była wykonana w Zakładzie Inżynierii Białka, Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Zakład ten posiada bogate tradycje pracy z modyfikowanymi w różny sposób białkami, a promotor dysertacji prof. Jacek Otlewski od lat jest uznanym w kraju i na świecie autorytetem naukowym w tej tematyce.

Dysertacja doktorska jest napisana w sposób niestandardowy, ponieważ składa się ze streszczenia, wprowadzenia, celu pracy, publikacji I, publikacji II i publikacji III (poprzedzonych krótkimi streszczeniami), następnie zawiera podsumowanie, bibliografię, dorobek naukowy (publikacje, zgłoszenia patentowe, doniesienia konferencyjne) oraz spis rysunków. Taki układ pracy jest ciągle dość rzadko spotykany, chociaż z drugiej strony zwięzły i zrozumiały. Z oświadczeń Autora wynika, że pomimo wieloautorskich prac naukowych udział Doktoranta w każdej pracy był wiodący.

Tematyka badawcza zawarta w pracy doktorskiej skupia się wokół konstrukcji celowanych koniugatów chemioterapeutyków. Jak słusznie zauważył Autor dysertacji doktorskiej pierwszy eksperyment tego typu był przeprowadzony jeszcze w latach 50-tych ubiegłego wieku, w którym połączono γ -globulinę z cytostatykiem metotreksatem. Od tamtej pory nieustannie trwają próby stworzenia makromolekuły jako wielofunkcyjnego narzędzia molekularnego, którego zadaniem jest dostarczenie terapeutyku do miejsca nowotworzenia. Znanymi przykładami cząsteczek kierujących są przeciwciała, które wchodzi w skład platform terapeutycznych takich jak: Trastuzumab emtansine, Inotuzumab ozogamicin, Sacituzumab govitecam, Belantamab mafodtin, czy jeszcze pięć innych dopuszczonych przez amerykańską instytucję rządową - Agencję Żywności i Leków (FDA) do stosowania na pacjentach.

Z drugiej strony zwiększona ekspresja receptorów białkowych na powierzchni komórek nowotworowych stwarza szanse na wykorzystanie dedykowanej cząsteczki skierowującej, która komplementarnie będzie się do nich wiązała jako specyficzny ligand dostarczający skoniugowany cytostatyk „na miejsce”.

Niniejsze podejście zostało zastosowane w recenzowanej dysertacji, w której modyfikowano platformę liganda białkowego FGF2, który łączy się na powierzchni komórek nowotworowych z receptorem FGFR1. Konceptyjnie w pracy przedstawiono sekwencyjną modyfikację liganda FGF2

od najmniej zaawansowanych układów makromolekularnych do wielostopniowej modyfikacji ligandów skierowujących za pomocą cząsteczek łączących i cytostatyków.

W początkowej części podjętych prac opisanych w pierwszej publikacji została wykorzystana cząsteczka FGF2 oraz jej modyfikacja różniąca się od natywnej struktury ilością cysteinowych reszt wiążących znajdujących się na powierzchni białka. Dodatkowo zostały wprowadzone zmiany poprzez przyłączanie do białka linkera peptydowego zawierającego resztę cysteinylową w sekwencji KCK. Ten zabieg przeprowadzono dla czterech wariantów białek w tym dla dwóch: 1) KCKSGG-FGF2; 2) FGF2-GGSKCK. Dalsze z nich zawierały zamiany C78 oraz C96 na reszty S78 i S96 w białku FGF2 WT oraz wprowadzenie sekwencji peptydowej KCKSGG na N-końcu dla jednej cząsteczki w wariantcie 3 oraz GGSKCK na końcu C białka w wariantcie 4. Autor dysertacji otrzymał makromolekuły zawierające jedną, dwie lub trzy wiążące reszty cysteinylowe. W trakcie konstrukcji narzędzia terapeutycznego do białka została przyłączona toksyna monometylo aurystatyna E połączona z łącznikiem *p*-aminobenzoksylokarbonylowym, łącznikiem dipeptydowym Val-Cit oraz grupą maleimidową. Następnie Doktorant przedstawił rezultaty oczyszczania sfunkcjonalizowanych białek, co zostało potwierdzone za pomocą spektrometrii mas. W kolejnym kroku została przeprowadzona analiza biofizyczna otrzymanych cząsteczek oraz ich powinowactwa do receptora FGFR1-IIIc. W dalszym etapie badań zostały przeprowadzone testy otrzymanych platform molekularnych potwierdzające zdolność aktywacji szlaków sygnałowych zależnych od FGFR1 oraz internalizowania ich do wnętrza komórki. Dodatkowo Autor pracy udowodnił, że koniugaty wykazują wysoką cytotoksyczność proporcjonalną do ilości receptorów znajdujących się na powierzchni komórki oraz od ilości cytostatyków przyłączonych do liganda kierującego.

Celem dalszych badań opisanych w drugiej publikacji było otrzymanie wielofunkcyjnej cząsteczki, której czas cyrkulacji w organizmie byłby dłuższy, niż początkowo zsyntezowanych makromolekuł, które ze względu na swój rozmiar powinny być szybko usuwane z krwiobiegu poprzez filtrację kłębuszkową. Strategia, która została przyjęta obejmowała koniugaty o zwiększonej hydrofilowości i promieniu hydrodynamicznym. Z tego względu zostały zsyntezowane platformy wielofunkcyjne białka FGF2 z aurystatyna Y (AY) zawierające poliglikolowe łączniki. Tym razem cząsteczka cytostatyku AY została przyłączona za pomocą końca C, a nie końca N tak jak w przypadku prac z monometylo aurystatyną E. Jako łącznika Autor dysertacji użył dipeptydu *L*-Thr-*D*-Val oraz grupę maleimidową, wraz z różnej długości łańcuchami poliglikolowymi (PEG-4, PEG 27). Ponadto, Autor we wstępie do publikacji napisał, że przyłączył resztę Cys, natomiast na rysunku 1a w pracy, oprócz aminokwasów *L*-Thr i *D*-Val jest reszta Lys, o której Doktorant nie wspomniał w części eksperymentalnej. Po otrzymaniu czterech wariantów makrocząsteczek zostały wykonane badania, które wykazały zwiększoną cytotoksyczność wobec komórek rakowych FGFR1 pozytywnych oraz zmniejszoną dla FGFR1 negatywnych. Zsyntezowane koniugaty nie wykazywały tendencji do agregacji i były stabilne w surowicy ludzkiej. Multifunkcyjna cząsteczka zawierająca łącznik poliglikolowy PEG 27 wykazała promień hydrodynamiczny odpowiadający białkom globularnym o masie cząsteczkowej ok. 60 kDa, czyli powyżej progu filtracji kłębuszkowej, przez co Doktorantowi udało się osiągnąć założony cel badań.

Ostatnia praca wieńczy dotychczasowe poszukiwania Doktoranta polegające na poszukiwaniu selektywnej platformy molekularnej do potencjalnej eradykacji guzów nowotworowych. W tej części pracy Autor dysertacji podjął się trudnego zadania połączenia dwóch

cytostatyków α -amanityny oraz monometylo aurystyny E do dimeru białkowego FGF2-FGF2. W tym celu Pan mgr Mateusz Krzyścik wykorzystał dotychczasowe doświadczenie w koniugowaniu cytostatyków do nośników białkowych. Jednakże, połączenie obu jednostek FGF2 ze sobą było trudne, z tego względu Doktorant wykorzystał technologię inżynierii białkowej z użyciem enzymu sortazy A wraz z odpowiednio sfunkcjonalizowanymi cząsteczkami białek. Powstała w ten sposób platforma terapeutyczna wykazała promień hydrodynamiczny równy białkom o masie ok. 62 kDa. Dodatkowo dwufunkcyjna cząsteczka nie wykazała efektu cytotoksyczności względem linii komórkowych FGFR ujemnych. Moim zdaniem otrzymanie dwufunkcyjnej makromolekuły o dużym potencjale terapeutycznym było największym osiągnięciem koncepcyjnym i laboratoryjnym Doktoranta.

Podsumowując dorobek naukowy Pana mgra Mateusza Krzyścika będący podstawą recenzowanej dysertacji można stwierdzić, że cel pracy został osiągnięty, a Doktorant poprzez szeroki zakres przeprowadzonych badań udowodnił ponadprzeciętne umiejętności pracy w laboratorium wraz z bardzo dobrze opanowanym warsztatem inżynierii białkowej. Pan mgr Mateusz Krzyścik jest współautorem 8 publikacji naukowych, dwóch zgłoszeń patentowych oraz jednego doniesienia konferencyjnego. Taki dorobek publikacyjny stawia Autora dysertacji pośród doktorantów, którzy wykazują bardzo dużą aktywność naukową.

W swoim zwyczaju nie wymieniam błędów językowych ani edytorskich, może tylko napiszę na przyszłość dla Doktoranta, żeby sprawdził literówki, których w tej pracy jest sporo. Jednocześnie chciałbym zaznaczyć, że wszelkie uwagi, które pozwoliłem sobie w tej recenzji wypisać, wynikają jedynie z obowiązku recenzenta i nie mają wpływu na merytoryczną wartość pracy.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana mgra Mateusza Adama Krzyścika spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z 18 kwietnia 2003 z późniejszymi zmianami i uzupełnieniami) „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki” i wnioskuję o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Dodatkowo, w świetle przedstawionych dokonań naukowych Doktoranta zawartych w dysertacji doktorskiej wnioskuję o jej wyróżnienie.

