



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

im. Ludwika Hirsztfelda

Polska Akademia Nauk

Centrum Doskonałości: IMMUNE

ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław

tel. (4871) 370 9982, fax: (4871) 370 9975

<http://iitd.pan.wroc.pl>; andrzej.gamian@hirsztfeld.pl

Prof. dr hab. Andrzej Gamian

Wrocław, 1.04.2022r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Lipok pt. „Selekcja i optymalizacja peptydowych antagonistów oddziaływania FGF1-FGFR1” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka Otlewskiego

Praca dotyczy badań nad wykorzystaniem do celów terapeutycznych nadekspresji w nowotworach receptora czynnika wzrostu fibroblastów 1 (FGFR1) lub jego liganda (FGF1). Próby zastosowania inhibitorów peptydowych do terapii nowotworów FGFR-zależnych były podejmowane już wcześniej, ale ich skuteczność okazywała się niewystarczająca. Dlatego podjęty temat pracy doktorskiej wychodzi naprzeciw aktualnych potrzeb medycyny, terapii celowanej. Tematyka tych badań wywodzi się z dorobku Zakładu Inżynierii Białka na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, jest efektem wieloletnich prac w zakresie inżynierii genetycznej i bogatego dorobku zespołu w tej dziedzinie. Poszukiwanie peptydowych inhibitorów szlaków enzymatycznych w kierunku zablokowania rozwoju nowotworu mieści się w najważniejszych trendach światowych w biochemii i medycynie. Badaniem objęto czynnik wzrostu fibroblastów FGF1 i jego receptor FGFR1, aby sprawdzić możliwości zahamowania oddziaływań między tymi cząsteczkami w stopniu umożliwiającym zastosowanie w leczeniu. Badania mają istotne znaczenie biologiczne, a wyniki mogą znaleźć wykorzystanie praktyczne w opracowywaniu nowych leków. Praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich, jest podzielona na rozdziały, na początku umieszczono streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, wstęp, następnie cel pracy, spis materiałów, część metodyczną, wyniki i dyskusję z podsumowaniem oraz spisy piśmiennictwa, rycin i tabel. Praca zawiera 135 stron maszynopisu wraz z 46 rysunkami i 26 tabelami, cytowanymi 199 pozycjami piśmiennictwa. We wstępie do rozprawy autorka wprowadza do tematyki, uzasadnia logicznie cel badań, omawia receptory fibroblastycznych czynników wzrostu, same ligandy FGF, aktywację szlaków sygnałnych zależnych od FGFR, ich deregulacje zależne i niezależne od liganda, by przejść do omawiania strategii terapii celowanych w leczeniu nowotworów. Opisuje inhibitory, peptydy, aptamery i przeciwciała skierowane wobec FGFR. Odnośnie czynników skierowanych wobec FGF wśród

potencjalnych leków przedstawia przeciwciała, peptydy, pułapki ligandu FGF, przybliży również kwestie związane z opornością na celowane terapie przeciwnowotworowe. Następnie omawia techniki zastosowania bibliotek fagowych do poszukiwania cząsteczek wiążących cel molekularny, ich konstruowanie, selekcję. Osobny rozdział poświęcono wykorzystaniu peptydów w terapii, zwłaszcza w leczeniu nowotworów i modyfikacjom peptydów terapeutycznych dla wydłużenia ich okresu trwania w krążeniu i polepszenia wiązania z antygenem. Wstęp podsumowuje opisem cyklizacji peptydów jako spodziewanej modyfikacji, która może przynieść korzyści w postaci lepszych efektów leczniczych. Cel badań formułuje w postaci przyjętej strategii poszukiwania peptydów będących antagonistami oddziaływania FGF1-FGFR1, czyli selekcji peptydów liniowych i cyklicznych wiążących się z receptorem lub ligandem.

Wydzielona część Materiały, z opisem linii komórkowych, podłoży hodowlanych, materiałów do biologii molekularnej, do pracy z białkami, do syntezy chemicznej, buforów i aparatury, pozwoliła na klarowny opis samych metod. W tej części opisano procedury selekcji fagowych bibliotek peptydów cyklicznych wiążących się do zewnątrzkomórkowej domeny FGFR1. Namnożone klony fagowe poddano sekwencjonowaniu, a wybrane badano w teście ELISA z opłaszczonym FGFR1-Fc, przy czym także uwzględniono wyniki dodatkowego testu względem Fc. Test kompetycyjny ELISA w obecności FGF pozwolił na otrzymanie dodatkowych informacji o charakterze wiązania danego klonu, poprawienia specyficzności selekcji. Po tym przeprowadzono syntezę, cyklizację i oczyszczanie peptydów, a następnie badanie aktywności szlaków sygnałowych zależnych od FGFR1 poprzez analizę wpływu peptydu na proliferację komórek ekspresjonujących FGFR1. Takie samo postępowanie zastosowano w przypadku peptydów cyklicznych wiążących się do FGF1, z użyciem ¹⁵N NMR do analizy wiązania peptydu z FGF1, następnie dla peptydów liniowych wiążących się z zewnątrzkomórkową domeną FGFR1, po czy dla peptydów liniowych wiążących się z FGF1. Metody są dobrze opisane, opatrzone rysunkiem wektora, schematem konstruktu, oraz 17 odpowiednimi tabelami, przez co rozdział i cała praca, jest logicznym, jednolitym wywodem.

Przeprowadzenie tych doświadczeń nad selekcją peptydów wiążących zewnątrzkomórkową domenę receptora czynnika wzrostu fibroblastów 1 i czynnika wzrostu fibroblastów 1, ich syntezą chemiczną i analizą aktywności hamowania oddziaływania FGFR1-FGF1 pozwoliło wyselekcjonować peptyd o najlepszych właściwościach antagonisty badanego oddziaływania. Autorka wykazała, że cykliczny peptyd R^oF8 oddziałuje w teście ELISA z FGFR1 i wiąże się w miejscu jego oddziaływania z FGF1, ponadto ma zdolność hamowania

fosforylacji kluczowych białek szlaku sygnałowego zależnego od FGFR1. Autorka wykazała, że ten cykliczny peptyd oddziałuje specyficznie z FGFR1c w doświadczeniach na linii BAF/3, nie jest cytotoksyczny wobec komórek linii BAF/3 FGFR1c, lecz w sposób dawkozależny osłabia żywotność tych komórek, co świadczy o zdolności RoF8 do hamowania oddziaływania FGF1-FGFR1. Inne peptydy, wobec FGF1, mianowicie 4 cykliczne i jeden liniowy, nie miały zdolności do blokowania interakcji FGF1-FGFR1. Przeformatowane 3 sekwencje liniowe wobec domeny FGFR1 do formatu Peptibody 6 okazały się stymulować namnażanie komórek linii NIH 3T3, co wykluczyło je z dalszych badań. Dlatego cykliczna forma peptydu RoF8 okazała się niezbędną strukturą wykazującą pożądaną aktywność biologiczną, potwierdzając tym samym słuszność wybranej strategii poszukiwania kandydatów do dalszych prac nad lekiem przeciwko nowotworom FGFR1-zależnych. Wyniki mają wartość podstawową i praktyczną w zakresie poszukiwania nowych terapeutyków. Dostarczają gotowy związek do dalszych badań na zwierzętach i w testach klinicznych. Interesującym byłoby porównanie poszukiwania peptydów metodą selekcji fagowej z metodą skanowania sekwencji badanego białka i mapowania peptydów z użyciem zestawu peptydów syntezowanych na polietylenowych słupkach [Carter, J.M. Epitope Mapping of a protein using the Geysen (PEPSCAN) procedure. In Peptide Analysis Protocols; Humana Press: New Jersey, NJ, USA, 2014; Volume 36, pp. 207–224, ISBN 0-89603-274-4], poproszę doktorantkę o komentarz na temat możliwości użycia tej metody do poszukiwania inhibitorów interakcji FGF1-FGFR1.

Dyskusja jest bardzo dobrze przeprowadzona, doświadczenia są omówione pod względem trudności technicznych, szczegółowo pokazano doświadczenia prowadzące do nieaktywnych lub niespecyficznych produktów lub o niepożądanych właściwościach, co też dostarcza wiele cennych informacji. Autorka umiejętnie podsumowuje uzyskane wyniki, w odniesieniu do piśmiennictwa. Tutaj należy podkreślić, że autorka jako pierwsza otrzymała peptyd cykliczny aktywny, pokazała że liniowy nie jest aktywny biologicznie, wykazała sposoby określania specyficzności wiązania peptydu do antygeny, przedstawia analizę ryzyka podejmowanych strategii badawczych w odniesieniu do poszukiwania peptydowych inhibitorów. Konkluzja autorki jest słuszna, że zmiana aminokwasu może zwiększyć siłę interakcji peptydu z białkiem.

Odnosnie uwag krytycznych dotyczą one strony redakcyjnej i to zaledwie kilku punktów. Pozycja piśmiennictwa 140 jest podana z błędnym rocznikiem, PBS to buforowany roztwór soli fizjologicznej (jak w spisie skrótów), więc nie potrzeba terminu ...bufor PBS... Bogaty w seryny region kwaśny receptora jest wart krótkiego wyjaśnienia. W tabeli 2 lepiej:

Zestawienie ssaczycy linii komórkowych używanych w trakcie pracy. W tabeli 5 lepiej dodać klasy wszystkich przeciwciał pierwszo- i drugorzędowych. W tabeli 6 mowa o pochodnych aminokwasów, a nie peptydach użytych jako substraty do syntezy peptydów. Odnośnie terminologii zbyt dużo użyto żargonowych określeń jak stok, eppendorfek, zworteksowano, falkonu, o/n, ...na podstawie ELISY...(Rys. 19), ...nie stymulowanych żadną molekułą... (Rys. 22). Na Rys. 33 powinno być ...(a) i F^o13 (b)... a nie ...(a) i F^o16 (b)... Stosowanie w nadmiarze takich słów pogłębia hermetyczność tekstów. Podsumowując, należy podkreślić że nie mam uwag krytycznych do pracy o dużej wartości, dobrze zaplanowanej i wykonanej. Wyniki przedstawiają cenne dane, które stanowią podstawę do dalszych badań. Praca jest oryginalnym wkładem w zakresie nauki podstawowej o potencjalnym znaczeniu praktycznym na polu biomedycznym, przyczynia się do istotnego poszerzenia wiedzy o konstrukcji docelowych peptydów terapeutycznych. Autorka wykazała się znajomością właściwie wykorzystanego piśmiennictwa.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr Magdaleny Lipok zawiera oryginalny materiał doświadczalny i spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o przyjęcie tej pracy doktorskiej i dopuszczenie mgr Magdaleny Lipok do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Pozwalam sobie również złożyć Wysokiej Radzie wniosek o wyróżnienie tej pracy ze względu na dużą wartość merytoryczną i bardzo dobre wykonanie części doświadczalnej oraz napisanie całej rozprawy.

KIEROWNIK
Zakładu Immunologii Chorób Zakaźnych
Andrzej Gancian
Prof. dr hab. Andrzej Gancian