

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Darii Nawrockiej

pt. „Aktywność biologiczna kowalencyjnych dimerów ludzkiego czynnika wzrostu fibroblastów 2 (FGF2)”

wykonanej na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego,
pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka Otlewskiego

Nowoczesna architektura budowlana często cechuje się innowacyjnymi koncepcjami projektowymi i zaawansowanymi technologiami. Do jednych z najbardziej nowoczesnych budowli na świecie, będących wytworem inżynierów należy na przykład Burj Khalifa (Zjednoczone Emiraty Arabskie), który jest najwyższym budynkiem na świecie. Wyróżnia się nie tylko wysokością, ale także nowoczesnymi rozwiązaniami konstrukcyjnymi i energetycznymi. Innym przykładem jest The Edge (Holandia). To biurowiec w Amsterdamie, który jest uważany za jeden z najbardziej ekologicznych budynków na świecie, wykorzystujący zaawansowane technologie zrównoważonej energii. Kolejnym przykładem jest The Gherkin (Wielka Brytania) – ten budynek w kształcie jaja mieści posiada charakterystyczną spiralną formę i jest przykładem futurystycznej architektury. Nowoczesna architektura otacza nas nie tylko w makroświecie ale także w mikroświecie. Dzięki postępom w dziedzinie biotechnologii i inżynierii genetycznej, mamy także możliwość stworzenia nowoczesnych budowli molekularnych – czyli np. białek o pożądanym właściwościach biologicznych. Podobnie jak architekt projektujący nowoczesne budowle, architekci molekularni muszą rozważyć różnorodne czynniki, takie jak funkcjonalność, wydajność, koszty produkcji, bezpieczeństwo i wykonywalność. Istnieje wiele przykładów sztucznie zaprojektowanych białek o ukierunkowanych właściwościach. Należą do nich na przykład liczne enzymy o ulepszonej

aktywności katalitycznej, rozszerzonej lub zmienionej specyficzności substratowej, a także podwyższonej lub odwróconej stereoselektywności. Podobnie więc jak architekci projektujący nowoczesne budowle, architekci molekularni tworzą nowe struktury o ulepszonych lub nowych właściwościach. Do takich architektów molekularnych zaliczyć można niewątpliwie mgr Darię Nawrocką, która w ramach swojej pracy doktorskiej zaprojektowała dimer czynnika wzrostu fibroblastów 2 (FGF2) w taki sposób aby uzyskać on silne właściwości przeciwnowotworowe wobec komórek posiadających na swojej powierzchni receptory tego białka (FGFR1).

Rozprawa doktorska mgr Darii Nawrockiej została wykonana pod opieką prof. dr hab. Jacka Otlewskiego w zakładzie Inżynierii Białka. Doktorantka przedstawiła wyniki swojej pracy w postaci dysertacji doktorskiej będącej zbiorem dwóch publikacji opatrzonej wstępem i syntetycznym opisem uzyskanych rezultatów badań. Otwiera ją streszczenie pracy w języku polskim i angielskim. Streszczenia napisane zostały w sposób poprawny i przystępny oraz są tożsame w treści. Następnie znajduje się wprowadzenie teoretyczne, cel pracy, krótkie omówienie wyników każdej z publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej oraz podsumowanie. Ta część pracy zawarta jest na 22 stronach maszynopisu. Pracę zamyka wykaz 143. pozycji literaturowych cytowanych przez Doktorantkę. Nie mam uwag co do części edycyjnej pracy doktorskiej. Nie wiem tylko dlaczego część odnośników literaturowych w spisie literaturowym posiada numery DOI.

W krótkim wprowadzeniu do dysertacji, mgr Daria Nawrocka podjęła się niełatwego zadania jakim było przedstawienie w sposób możliwie syntetyczny, informacji na temat czynnika wzrostu fibroblastów 2 (FGF2), jego roli w sygnalizacji komórkowej oraz o jego zastosowaniu w potencjalnych terapiach przeciwnowotworowych. Opisała również inne, niż FGF2 cząsteczki biologiczne stosowane w przeciwnowotworowych terapiach ukierunkowanych. Z zadania polegającego na wprowadzeniu czytelnika w sposób możliwie syntetyczny w tematykę rozprawy doktorskiej Autorka wywiązała się bardzo dobrze. Zabrakło mi jedynie informacji na temat zastosowań białka FGF2 w medycynie regeneracyjnej. Lektura wstępu teoretycznego pokazuje dużą biegłość Doktorantki w tematyce rozprawy doktorskiej. Szczególną uwagę zwracają podziękowania, skierowane do Promotora, współpracowników i rodziny w tym do Dzieci. Ich treść wskazuje, że Doktorantka wykonywała pracę w sprzyjającej atmosferze zarówno w aspekcie rozwoju naukowego, jak i kontaktów międzyludzkich.

Motywacją dla Doktorantki do realizacji pracy doktorskiej był fakt, że komórki nowotworowe, takich nowotworów jak rak płuc, piersi, pęcherza moczowego, prostaty czy trzustki, nadmiernie produkują na swojej powierzchni receptory FGFR1. W wielu nowotworach dochodzi również do zwiększonej aktywacji tych receptorów, co sprzyja rozwojowi nowotworów ale przede wszystkim prowadzi do oporności na terapie konwencjonalne. Doktorantka postanowiła więc zmodyfikować białko FGF2 w taki sposób aby po pierwsze selektywnie i w

większym stopniu wiązało się z komórkami posiadającymi receptory FGFR1 a po drugie aby białko to było nośnikiem chemoterapeutyku. Dlatego też, pierwszym celem badań recenzowanej pracy doktorskiej **było zbadanie wpływu modyfikacji białka FGF2, poprzez jego dimeryzację, na jego potencjał biologiczny**. Drugim celem pracy doktorskiej **było skonstruowanie dimeru FGF2, z przyłączonymi lekami przeciwnowotworowymi, celującego w receptor FGFR1**.

W kolejnej części mgr Daria Nawrocka bardzo krótko przedstawia założenia i wyniki dwóch opublikowanych prac, stanowiących rdzeń rozprawy. Obie prace zostały opublikowane w *Int. J. Mol. Sci.* (2020 i 2023). W obu publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, co świadczy o jej dominującym wkładzie w prace eksperymentalne i edytorskie związane z przygotowaniem manuskryptów. W każdej publikacji istnieje informacja dotycząca wkładu pracy poszczególnych autorów w przywoływane publikacje, zatem „prawa” Doktorantki do wykorzystania tych publikacji w dysertacji są uzasadnione. Publikacje przedstawione są w porządku skutkowo-przyczynowym. Pierwsza publikacja to praca w której Doktorantka zaprojektowała osiem różnych dimerów białka FGF2, otrzymała je i przebadła. Podczas projektowania nowych cząsteczek skorzystała z wieloletnich doświadczeń zespołu kierowanego przez prof. Otlewskiego. Na podstawie wyników z testów internalizacji dimerów, Doktorantka wybrała najlepsze ułożenie monomerów względem siebie. W drugiej publikacji wykorzystwała wybraną wcześniej wzajemną orientację białek, do skonstruowania nowego dimeru z przyłączonymi związkami przeciwnowotworowymi.

W pierwszej publikacji Doktorantka na początku zaprojektowała i otrzymała osiem nowych wariantów dimerów białka FGF2. W celu uzyskania dimerów zastosowała łącznik z glikolu polietylenowego (PEG) o różnej długości (PEG2 i PEG12). Do dimeryzacji wykorzystwała trzy różne mutanty białka FGF2. Mutanty te różniły się posiadaniem dodatkowej, powierzchniowo zlokalizowanej reszty cysteiny na N- lub na C-końcu lub naturalnie występującej reszty cysteiny w pozycji 96. Otrzymane dimery FGF2 posiadały właściwe masy cząsteczkowe, były stabilne (nawet bez obecności heparyny) a ich struktura przestrzenna była tożsama ze strukturą białka natywnego. W kolejnych etapach Doktorantka sprawdziła ich właściwości biologiczne. Okazało się, że dimery posiadają właściwości proliferacyjne oraz pozytywnie wpływają na aktywność promitogenną FGF2, posiadają zwiększony potencjał antyapoptyczny w stosunku do monomeru oraz wykazują zwiększoną zdolność do indukowania migracji komórek. Wyniki tych badań wskazują na brak różnic pomiędzy badanymi dimerami. Dopiero testy na internalizację dimerów zróżnicowały dimery pod względem ich aktywności. Okazało się że długość łącznika oraz odpowiednia orientacja dimerów względem siebie wpływa na proces internalizacji. Najlepsze parametry uzyskały cząsteczki dimerów C96-PEG2-C96, N-PEG12-N, N-PEG12-C oraz C96-PEG12-C96. Zabrakło mi w tym miejscu dyskusji na temat roli orientacji przestrzennej obu dimerów względem siebie w oddziaływaniu z receptorem. Ponieważ znana jest struktura przestrzenna kompleksu FGF2-FRGR1 (3OJV) to może warto byłoby pospekulować na ten temat?

Druga publikacja to niejako kontynuacja pierwszej, gdyż Doktorantka wybrała topologię jednego z najbardziej aktywnych dimerów i wykorzystała go do skonstruowania bardziej zaawansowanej „budowli molekularnej”, której zadanie miało polegać na selektywnym dostarczaniu leku cytotoksycznego do komórek nowotworowych z nadekspresją FGFR1. W tym celu zaprojektowała dwa monomery białka FGF2 oraz jeden dimer. Pierwszy monomer posiadał linker GGSKSK na C-końcu oraz mutacje punktowe C78S i C96S. Natomiast drugi monomer zawierał linker KSKSGG na N-końcu oraz identyczne mutacje punktowe. W celu skonstruowania dimeru połączyła oba monomery poprzez sekwencję oddzielającą (SGG)₁₁. Dodatkowo, aby umożliwić przyłączenie leków cytotoksycznych metodami ligacji enzymatycznej wprowadziła do obu monomerów i do dimeru specyficzne dla tych enzymów sekwencje aminokwasowe na N- i/lub na C-końcu. W celu przyłączenia leków cytotoksycznych do białek metodą ligacji enzymatycznej Doktorantka zsyntezowała peptydy o sekwencji rozpoznawanej przez ligazy, połączonej z cysteiną przez ugrupowanie PEG. Tak zsyntezowany peptyd posłużył do przyłączenia przez ugrupowanie maleimidowe, umożliwiające reakcję z grupą tiolową cysteiny, dwóch leków przeciwnowotworowych tj. amantyny alfa – α AMTN, oraz monometylo aurystatyny E – MMAE. W wyniku reakcji enzymatycznej jedna lub obie peptydowe pochodne leków cytotoksycznych zostały przyłączone do monomerów (po jednym leku do każdego z monomerów) lub do dimeru (dwa leki do dimeru). Otrzymane białka zostały scharakteryzowane i oczyszczone a następnie poddane badaniom pod względem ich cytotoksyczności względem komórek z nadekspresją receptora FGFR1. Okazało się, że dimer białka wykazywał znacznie wyższą cytotoksyczność względem nowotworowych linii komórkowych aniżeli monomery (również zmieszane). Dodatkowo, dimer charakteryzował się doskonałą internalizacją, co wskazuje, że dimer posiadający przyłączone dwa różne leki może być potencjalnym lekiem przeciwnowotworowym o zwiększonym potencjale względem komórek z nadekspresją receptora FGFR1. Zaprojektowane i otrzymane białka dowodzą w mojej opinii, że Doktorantka w pełni zasługuje na miano architekta molekularnego.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że w obu publikacjach można znaleźć bardzo dojrzałe dyskusje, które poruszają każdy aspekt badanego problemu i są zestawione z najnowszymi danymi literaturowymi. Zawarte w dysertacji publikacje są w mojej opinii prawidłowo zaplanowane, metody dobrane właściwie a wyniki zinterpretowane prawidłowo. Warto również podkreślić, że Doktorantka zastosowała nowoczesne techniki z zakresu inżynierii molekularnej, biofizyki i biologii komórkowej. Obie publikacje zawierają bogaty materiał eksperymentalny, którym można by obdarzyć ze cztery publikacje.

Recenzowanie pracy, będącej zastawieniem już ocenionych wcześniej publikacji nie ułatwia Recenzentowi zadania spełnienia tzw. „obowiązku recenzenckiego”, czyli wyszukania jej słabszych punktów. W przedstawionej dysertacji udało mi się znaleźć ich ledwie kilka.

- 1) W nawiązaniu do informacji przedstawionej na stronie 15 o zastosowaniu czynników wzrostu FGF2 w medycynie regeneracyjnej, chciałabym zapytać czy badane przez Doktorantkę dimery białka FGF2 mogą być bezpiecznie i długotrwale stosowane w aspekcie regeneracji uszkodzonych tkanek? Jaka i gdzie jest granica pomiędzy regeneracją a nowotworzeniem podczas stosowania czynników wzrostu?
- 2) Jak, według Doktorantki, można by zaprojektować dimer, który wykazywałby słabszą aktywność biologiczną niż natywne białko? W jaki sposób należałoby go zbudować? Czy tak skonstruowany dimer mógłby być kontrolą negatywną?
- 3) Czy w ramach prac nad pierwszą publikacją podjęte były próby mające na celu wyznaczenie wartości K_D pomiędzy dimerami a domeną zewnątrzkomórkową receptora FGFR1? Wartości tych stałych mogłyby rzucić pełniejszy obraz na temat zależności struktura-aktywność badanych układów.
- 4) Na rysunku 3D (str. 23) w pierwszej publikacji widać niewielki wzrost intensywności fluorescencji dla niektórych dimerów w porównaniu z monomerem. Z czego może to wynikać?
- 5) Co mogło powodować (str. 28) tworzenie słabo rozpuszczalnych klastrów na powierzchni komórek przez znakowane (DyLight 550) białko FGF2? Jaką inną technikę (bez znakowania) można by zastosować do badania stopnia internalizacji dimerów?
- 6) Zwykle bakterie słabo tolerują wielokrotne i identyczne powtórzenia sekwencji w swoim DNA. Z jaką wydajnością udało się uzyskać białka z linkerem w którym było aż jedenaście powtórzeń sekwencji SGG (str. 45)?
- 7) Dlaczego jako linker wybrana została sekwencja GGSKSK na C-końcu oraz KSKSGG na N-końcu (str. 45) białek opisanych w drugiej publikacji?
- 8) Jaka jest szansa na wprowadzenie do kliniki opracowanego w ramach pracy doktorskiej dimeru z dwoma, różnymi przyłączonymi związkami cytotoksycznymi. Czy od strony ekonomicznej taki lek przeciwnowotworowy miałby szansę na wdrożenie?

Reasumując, uważam, że cele pracy doktorskiej zostały w pełni zrealizowane a Doktorantka z pewnością zasługuje na miano architekta molekularnego. Do najważniejszych osiągnięć pracy, stanowiących jednocześnie element nowości naukowej, zaliczam uzyskanie zupełnie **nowych białek i ich koniugatów z lekami przeciwnowotworowymi** oraz ich pełną charakterystykę oraz udowodnienie, że białka mogą być doskonałym nośnikiem leków w różnego typu terapiach. Wartość merytoryczną rozprawy mgr Darii Nawrockiej potwierdza fakt, że jest to materiał już opublikowany, a więc przepuszczony przez gęste sito wnikliwych recenzji specjalistów w dziedzinie. Na zakończenie recenzji warto podkreślić, że p. Daria Nawrocka jest współautorem sześciu publikacji naukowych w czasopiśmie z listy JCR. Dwie z tych publikacji to materiał

umieszczony w pracy doktorskiej. W czterech z nich jest pierwszym autorem, co dowodzi na jej duży wkład merytoryczny w powstałe prace.

Uważam, że tematyka pracy doktorskiej jest bardzo interesująca i niezwykle potrzebna w świetle pogarszających się statystyk zachorowalności na choroby nowotworowe. Część doświadczalna pracy doktorskiej została dobrze zaplanowana a wyniki przedyskutowane i zinterpretowane. Rozprawa doktorska Pani Darii Nawrockiej zawiera bogaty, solidny i wartościowy materiał doświadczalny. Biorąc pod uwagę powyższe fakty, stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z wymaganiami artykułu 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574 z późn. zm.). W tym odniesieniu wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Darii Nawrockiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.



Sylwia Rodziewicz-Motowidło