



Kraków, czerwiec 2022 r.

Recenzja Rozprawy Doktorskiej
pt. Regulacja przestrzennej dystrybucji receptora 1 czynników wzrostu fibroblastów przez
multimeryczne ligandy oparte o motywy coiled-coil oraz oligomeryczne warianty GFP
autorstwa mgr Natalii Porębskiej

Praca Doktorska dotyczy badania receptora 1 czynników wzrostu fibroblastów (FGFR1) - jego organizacji na powierzchni komórki, wpływu tej organizacji na funkcję receptora oraz na jego transport komórkowy.

Receptor ten jest ciekawym ważnym obiektem badań z punktu widzenia biologii komórki, gdyż bardzo złożone i ciągle niepoznane do końca są odpowiedzi wewnątrzkomórkowe wywołane przez aktywację tego receptora, ale też FGFR1 jest ważnym obiektem badań m.in. z uwagi na fakt, że opisywana jest jego nadekspresja w wielu typach nowotworów - dlatego badania te mają wysoki potencjał translacyjny. Jak zaznacza Autorka - „...ligandy FGFR1 mogą być wykorzystane jako nośniki leków cytotoksycznych w medycynie precyzyjnej...”, co jest ostatnio bardzo nośnym określeniem.

W publikacjach przedstawionych jako Rozprawa Doktorska opisano identyfikację nowych partnerów białkowych wpływających na stan oligomeryczny receptora oraz opracowano metody indukcji pożądanego stanu oligomerycznego FGFR1 a także opracowano oligomeryczne koniugaty cytotoksyczne o zwiększonym powinowactwie do FGFR1, mogące selektywnie eliminować komórki nowotworowe, o których wiadomo, że wykazują nadprodukcję FGFR1. Prace te zostały opublikowane w czasopiśmie o uznanej renomie międzynarodowej i wysokim współczynniku wpływu (łącznie *impact factor* 24,74). W skład Rozprawy Doktorskiej wchodzi cztery publikacje - jedna przeglądowa i trzy doświadczalne. Udział poszczególnych współautorów tych prac jest dobrze określony i wskazuje na wiodącą rolę mgr Natalii Porębskiej w każdej z nich. (Nawiasem mówiąc, nie mam pozytywnego stosunku do tabelki z procentowym udziałem współautorów, zwłaszcza z udziałem określonym na 2% i to w przypadku, gdy w publikacjach określono mniej więcej co kto robił... Ale rozumiem, że formalne względy wymuszają konstruowanie takich tabelki).



Eksperymenty zostały wykonane w Zakładzie Inżynierii Białka pod kierunkiem dr hab. Łukasza Opalińskiego, promotora Rozprawy.

Cała Rozprawa robi bardzo dobre wrażenie - Autorka rozpoczyna ogólniejszym Wprowadzeniem w tematykę badań, jasno określa Cele pracy a następnie przedstawia publikacje stanowiące Rozprawę - każda z tych znakomitych publikacji jest poprzedzona krótkim opisem w języku polskim, streszczającym niejako jej zawartość. Całość zamyka Podsumowanie oraz Bibliografia a także spis publikacji, w których mgr Natalia Porębska jest współautorem. Ponadto, dołączone są oświadczenia o udziale współautorów w każdej z publikacji stanowiących Rozprawę Doktorską.

To „bardzo dobre wrażenie” wynika nie tylko z klarownego układu pracy, jasnych opisów w języku polskim ale przede wszystkim z zawartości merytorycznej opublikowanych prac, obfitujących w wartościowe wyniki o dużym potencjale translacyjnym.

Publikacja (1): *Targeting cellular trafficking of fibroblast growth factor receptors as a strategy for selective cancer treatment*, J. Clin. Med., 2019, jest pracą przeglądową i podsumowuje stan wiedzy na temat zarysowany w tytule, szczególnie koncentrując się na roli receptorów dla FGF w procesie nowotworzenia, mutacji które mogą za to odpowiadać, deregulacji ścieżek sygnalizacyjnych, mechanizmów aktywacji tych receptorów, uruchamianych przez nie kaskad biochemicznych w komórce a także internalizacji i wewnątrzkomórkowych losów receptorów FGFR. Stanowi to bardzo dobre kompendium wiedzy na temat tych receptorów i ich ligandów. Cieszy, że znalazły się w tej publikacji wzmianki o FGFR rezydujących w jądrze komórkowym, chociaż mało jest informacji o funkcjach, jakie tam pełnią oraz o ciekawych danych wskazujących, że dimeryzacja tych receptorów może zachodzić bez działania specyficznego liganda. Bibliografia tej pracy obejmuje 208 pozycji literatury.



Publikacje doświadczalne to

(2) *Differential regulation of fibroblast growth factor receptor 1 trafficking and function by extracellular galectins*, Cell Commun. Signal, 2019;

(3) *Dissecting biological activities of fibroblast growth factor receptors by coiled-coil-mediated oligomerization of FGF1*, Int. J. Biol. Macromolecules, 2021;

(4) *Intrinsically fluorescent oligomeric cytotoxic conjugates toxic for FGFR1-overproducing cancers*, Biomacromolecules, 2021.

Wszystkie one są znakomite, zawierają mnóstwo wartościowych wyników uzyskanych bardzo wieloma wysoce zaawansowanymi technikami badawczymi z zakresu biochemii, biologii komórki i biologii molekularnej. Między innymi były to następujące podejścia badawcze: produkcja białek rekombinowanych, w tym złożonych koniugatów, i ich oczyszczanie różnymi technikami, ale też i synteza peptydów, znakowanie fluorescencyjne białek, techniki interakcyjne połączone ze spektrometrią mas, analizy bioinformatyczne, ocena oddziaływań międzycząsteczkowych wraz z oceną kinetyki tych oddziaływań (techniką interferometrii bio-warstwowej BLI), pracochłonne badania stabilności oligomerów FGF1 (Western blot) i koniugatów (m.in. obrazowanie UV), wymagająca elektroforeza białek w warunkach natywnych, hodowle wielu linii komórkowych i badania z zakresu biologii komórki, takie jak aktywność proliferacyjna, apoptotyczna, mitogenna, metaboliczna, badania cytotoksyczności, badania szlaków przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych czy internalizacji błonowych receptorów, zaawansowane analizy mikroskopowe, cytometria przepływowa.

Jest to zaiste imponujący zestaw, świadczący o zaawansowanych umiejętnościach i szerokich horyzontach Autorki i Zakładu, w które, a przede wszystkim te rozliczne techniki badawcze pozwoliły na uzyskanie ogromnej ilości wartościowych wyników.

Wszystkie prace - chociaż publikowane osobno - stanowią całość, co też Autorka opisała skrótowo w Podsumowaniu. Publikacje przyniosły dane na temat możliwego mechanizmu modulującego przekazywanie sygnałów przez FGFR1 oraz wewnątrzkomórkowego transportu receptorów, co zostało następnie wykorzystane do opracowania kontrolowanej oligomeryzacji receptora za pośrednictwem oligomerycznych ligandów opartych o FGF1. Białka FGF1 oligomeryzowano za pomocą zrębu białkowego



GFPp, co pozwoliło dodatkowo śledzić fluorescencję. Ciekawe było wykazanie - co Autorka podkreśla - że można rozdzielić mitogenną aktywność FGFR1 od aktywności metabolicznej w zależności od stanu oligomerycznego receptora i że ten stan można wymusić poprzez modyfikację liganda, FGF1. Ponadto, opracowano metodę generowania oligomerycznych fluorescencyjnych koniugatów cytotoksycznych, które mogą być wydajnie i selektywnie internalizowane do komórek wykazujących ekspresję receptora FGFR1.

Całość jest klarownie przedstawiona, dobrze opisana nie tylko w publikacjach, ale także w polskojęzycznych rozdziałach. Trudno w zasadzie o jakieś uwagi krytyczne, zwłaszcza że prace te przeszły wnikliwy proces recenzji w poszczególnych redakcjach.

Mimo tego, pozwolę sobie na uwagi/pytania:

1. we wszystkich publikacjach jest wiele wyników uzyskanych techniką Western blot - nie są one w żaden sposób kwantyfikowane, nie ma - poza Publikacją 4 - zaznaczonych mas rozdzielanych białek - mam krytyczny stosunek do takiego sposobu przedstawiania wyników uzyskanych tą techniką; w publikacjach stanowiących Rozprawę jest wiele przykładów, kiedy - bez kwantyfikacji wyników WB - określa się, że w danej sytuacji doświadczalnej danego białka jest mniej albo więcej... Np. w Publikacji 3, Fig. 4C mamy „slight increase” albo „strong increase”;
2. co do degradacji FGFR1 (Publikacja 3, Fig. 3C; Publikacja 4, Fig. 5D) - czy są jakieś produkty tej degradacji, które byłyby widoczne, gdyby nie „wycinano” określonych prążków? Czy też degradacja w tym przypadku polega na tym, że przecinany jest akurat fragment w epitopie rozpoznawanym przez zastosowane przeciwciało?
3. w każdej publikacji zastosowano te same przeciwciała skierowane np. wobec FGFR1 - przeważnie widzimy 2 prążki, ale czasem wyraźny jest jeden prążek - czy jest na to jakieś wyjaśnienie?
4. jeszcze Publikacja 3 - stymulacja pobierania glukozy, Fig. 7 - czy to na pewno jest „dose-dependent manner”, w jaki „wild type FGF1 stimulated glucose uptake”...?
5. w Publikacji 4 badano 4 linie komórkowe o różnym poziomie ekspresji FGFR1, co można ocenić „na oko” z Ryciny 6A. Wydaje się, że linia NCI-H1581 ma tak samo niewiele FGFR1 jak linia „kontrolna”, HCC-15, a jednak koniugat z monometylo aurystatyną wykazuje silne działanie cytotoksyczne - dlaczego tak jest?
6. Jak rozpuszczano związek PD173074?



7. I tak ogólnie, jaki jest właściwie obraz aktywacji FGFR1 przez FGF1 w czasie: z badań przedstawionych w Rozprawie wynika, że obecność 20 ng/ml FGF1 przez 15 min wystarcza do uruchomienia kaskady zdarzeń biochemicznych (fosforylacja receptora, uruchomienie ścieżki ERK1/2) chociaż do badania internalizacji FGFR1 zastosowano 200 ng/ml FGF1 przez 2 h, do obserwowania degradacji FGFR1 – trzeba było obecności FGF1 w tym stężeniu przez 3 h, w badaniu aktywności apoptotycznej już FGF1 był obecny przez 16 h („caspase 3/7 activity assay”) lub 24 h („annexin assay”) w stężeniu 200 ng/ml a do stymulacji pobierania glukozy potrzeba było 20 h. Z kolei do stymulacji aktywności proliferacyjnej wystarczyło stężenie 1 ng/ml (i 48 h obecności FGF1 w medium hodowlanym). Czy parametry kinetyczne oddziaływania FGF1 z receptorem FGFR1 wyznaczone metodą BLI były w jakikolwiek sposób pomocne przy dobieraniu stężeń FGF1? (Z obliczeń wynika, że stężenia rzędu nanogramów w mililitrze to rząd 10^{-10} M a wyznaczone stałe dla FGF 1 WT (Publikacja 3, Tab. 2) są rzędu 10^{-8} M).

Reasumując, przedstawioną do recenzji Rozprawę Doktorską mgr Natalii Porębskiej oceniam bardzo wysoko, gratuluję zarówno Autorce jak i Promotorowi.

Stwierdzam, że Rozprawa spełnia wymagania określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. Ustaw z 2018 r. poz. 1668 z późn. zmianami) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Natalii Porębskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i proponuję wyróżnienie tej Rozprawy stosowną nagrodą.

Dnielniński - Tomaszewski

