



dr hab. n. med. Hanna Romańska-Knight,
prof.UM w Łodzi
Zakład Patologii Katedra Onkologii
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Pomorska 251
92-213 Łódź
tel.:+4842 2725605
e-mail: hanna.romanska-knight@umed.lodz.pl

Łódź, 4 lipca 2022

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Joanny Poźniak zatytułowanej
„Modulacja działania receptora 1 czynników wzrostu fibroblastów poprzez kontrolę
dystrybucji tego receptora na powierzchni komórek”**

Oceniana rozprawa dotyczy niezwykle istotnego zagadnienia, jakim jest projektowanie skutecznych terapii celowanych w leczeniu nowotworów. Koniugaty przeciwciało-lek (ADC) należą obecnie do najszybciej rozwijających się klas leków w onkologii. Jakkolwiek postęp w metodach biochemii i inżynierii białka zaowocował już dopuszczeniem kilkunastu z nich do praktyki klinicznej, poprawa efektywności, specyficzności i profilu toksyczności ADC wciąż stawiają przed nauką trudne wyzwania. U ich podstaw leżą nie w pełni poznane mechanizmy molekularne interakcji pomiędzy cząsteczką ADC a komórką nowotworową.

Doktorantka podejmuje ten ważny temat, obierając szlak FGF1-FGFR1, którego zaburzenia są powszechne w większości guzów litych, za modelowy cel molekularny.

Do recenzji przedstawiono pracę w formie spójnego cyklu pięciu publikacji – 1 praca przeglądowa i 4 oryginalne - wydaną z komentarzem w formie książkowej. Prace opublikowane zostały w okresie od 2019-2021, ich łączny IF wynosi 32,661 i we wszystkich Doktorantka jest pierwszym autorem. Rozprawa zawiera 158 numerowanych stron, jest wydana estetycznie i składa się z typowych części – wprowadzenia, celu pracy, publikacji poprzedzonych krótkimi omówieniami, podsumowaniem i piśmiennictwem. Całość jest uzupełniona streszczeniami w języku polskim i angielskim, dorobkiem naukowym, spisem rysunków, suplementami do publikacji II i V oraz oświadczeniami współautorów publikacji. W rozprawie powołano się na 77 pozycji starannie dobranych prac naukowych pochodzących z pism o zasięgu międzynarodowym.

Wprowadzenie przedstawia koncepcję terapii celowanych w onkologii. Omówienie roli sygnalizacji FGFR1 w kancerogenezie i mechanizmów jej regulacji prowadzi w dalszej części do uzasadnienia wyboru osi FGF-FGFR1 jako obiektu przeprowadzonych badań. Autorka przechodzi dalej do podsumowania danych literaturowych, dostępnych w momencie rozpoczęcia badań, dotyczących ścieżek internalizacji FGFR1, co w efekcie prowadzi do sformułowania dwuczłonowej hipotezy zakładającej zależność pomiędzy: 1) endocytozą FGFR1 i rozmieszczeniem receptora w błonie komórkowej oraz 2) oligomeryzacją cząstek kierujących i wydajnością dostarczania koniugatów cytotoksycznych do komórek FGFR1-dodatnich.

W kolejnym rozdziale omówiono cel pracy weryfikujący w/w hipotezę i obejmujący postawione przed rozprawą następujące zadania:

- 1) skonstruowanie zróżnicowanych multimerycznych ligandów FGFR1 (z wykorzystaniem FGF1 oraz fragmentu przeciwciała rozpoznającego zewnętrzną domęną receptora) modulujących stan oligomeryczny receptora na powierzchni błony komórkowej;
- 2) wytworzenie multimerycznego, cytotoksycznego koniugatu o silnym powinowactwie do FGFR1, zwiększonej wydajności internalizacji oraz specyficznej cytotoksyczności względem komórek FGFR1-dodatnich oraz
- 3) opracowanie modularnego systemu umożliwiającego skonstruowanie oligomerycznych, wydajnie internalizowanych i wysoce cytotoksycznych koniugatów, adaptowalnego do innych celów terapeutycznych w onkologii.

Kolejne części rozprawy (5-9) stanowią omówienia poszczególnych prac cyklu.

Pierwsza z nich zatytułowana „*Cross-talk between Fibroblast Growth Factor Receptors and Other Cell Surface Proteins*” opublikowana w 2019 r. w *Cells* ma charakter przeglądu piśmiennictwa. Podsumowano w niej obecny stan wiedzy na temat wielopoziomowego systemu regulacji sygnalizacji FGF-FGFR, zwracając szczególną uwagę na znacznie biologiczne oddziaływań FGFRs z innymi białkami powierzchniowymi. Praca ta nie jest odpowiedzią na żaden z założonych celów, stanowi zaś znakomite tło merytoryczne dla dalszej części rozprawy.

Publikacja druga zatytułowana „*FGFR1 clustering with engineered tetravalent antibody improves the efficiency and modifies the mechanism of receptor internalization*”, opublikowana w *Molecular Oncology* w 2020 r., opisuje wyniki dotyczące celu pierwszego. W pracy zbadano wpływ oligomeryzacji FGFR1 na aktywność i transport komórkowy receptora, wykorzystując stworzony tetrawalentny fragment przeciwciała T-Fc rozpoznający antygeny w obrębie domeny D1 receptora. Wykazano, że przestrzenna organizacja FGFR1 posiada istotne znaczenie w transporcie komórkowym tego receptora a klastrowanie indukowane oligomerycznym ligandem zwiększa wydajność endocytozy i moduluje jego internalizację, identyfikując tym samym nieznaną dotąd mechanizm regulujący funkcję FGFR1, o kluczowym znaczeniu dla jego użyteczności jako nośnika leku cytotoksycznego.

W publikacji trzeciej zatytułowanej „*FGF1 fusion with the Fc fragment of IgG1 for the assembly of GFPpolygons mediated multivalent complexes targeting FGFRs*”, opublikowanej w *Biomolecules* w 2021 r. Doktorantka kontynuuje badania objęte celem pierwszym, przechodząc do opracowania nowego sposobu oligomeryzacji FGFR1 opartego na naturalnym ligandzie FGFR1 (FGF1) w fuzji z fragmentem Fc ludzkiej IgG1 i użyciem GFPpolygonów jako białkowych rusztowań wiążących. Efektem końcowym badań jest panel ligandów o różnym stanie oligomerycznym. Przedstawione wyniki potwierdzają skuteczność zaprojektowanej strategii jak również, co ważne z punktu widzenia jej potencjalnej aplikacyjności, pokazują że stan oligomeryczny liganda decyduje o transporcie komórkowym FGFR1, co sugeruje, że jego wybór powinien być podyktowany pożądanym efektem terapeutycznym.

Publikacja czwarta zatytułowana „*The cytotoxic conjugate of highly internalizing engineered tetravalent antibody T-Fc for targeting FGFR1-overproducing cancer cells*” opublikowana w marcu b.r. w *Molecular Medicine* przedstawia kolejny etap badań, którego celem była ocena możliwości wykorzystania skonstruowanego wcześniej białka jako selektywnego nośnika preparatu cytostatycznego. Pokazano, że nowo utworzona cząsteczka składająca się z tetrawalentego T-Fc, łącznika walinowo-cytrulinowego i aurystatyny E jednometylowanej (MMAE) spełniała kryteria wysoce specyficznego i efektywnego produktu ADC. Analizując jego działanie w panelu linii komórkowych pochodzących z tkankowo zróżnicowanych nowotworów o różnym poziomie ekspresji FGFR1 pokazano również, że jego efekt cytotoksyczny zależy w głównej mierze od zdolności internalizacji receptora.

Zostało to potwierdzone obserwacją w linii komórkowej pochodzącej z przerzutowego raka płuca, w której mimo wysokiego poziomu ekspresji FGFR1, odpowiedź na lek była porównywalna do efektu obserwowanego w komórkach FGFR1-ujemnych. Komentując to zjawisko, Doktoranta sugeruje, że „przy wyborze potencjalnego celu molekularnego w terapii celowanej należy brać pod uwagę nie tylko poziom receptora na powierzchni komórek nowotworowych, ale przede wszystkim zdolność do jego efektywnej internalizacji” (strony 90-91). Jakkolwiek w kontekście obserwowanego zjawiska powyższa uwaga jest ze wszech miar słuszna, rozwiązanie tego problemu w praktyce klinicznej, czemu ostatecznie służyć ma projektowana cząsteczka, nie jest oczywiste. **Stąd moja prośba do Doktorantki o sugestie / propozycje rozwiązań umożliwiające potencjalną aplikacyjność prezentowanych wyników.**

W publikacji piątej zatytułowanej „Modular self-assembly system for development of oligomeric, highly internalizing and potent cytotoxic conjugates targeting fibroblast growth factor receptors” opublikowanej w 2021 r. w *Journal of Biomedical Science*, wykorzystując uzyskane uprzednio wyniki, skupiono się na opracowaniu modularnego systemu do generowania oligomerycznych i wysoce cytotoksycznych koniugatów, który byłby adaptowalny do różnych celów terapeutycznych. Stosując tetrameryczną streptawidynę skonstruowano oligomeryczny koniugat FGF1 pozwalający ostatecznie na wytworzenie kompleksu wykazującego silne i specyficzne działanie cytotoksyczne. Potwierdzeniem modularności systemu było wykazanie, że jest on łatwo adaptowalny zarówno względem ligandów, jak i receptorów powierzchniowych – w pracy zastosowano odpowiednio FGF2 i HER2. Wyniki przedstawionych badań wskazują, że wytworzony system, ze względu na swoją uniwersalność, swoistość i efekt cytotoksyczny, może znaleźć duże zastosowanie kliniczne jako podstawa w projektowaniu nowych, bardziej skutecznych strategii terapeutycznych.

W podsumowaniu rozprawy Autorka odnosi się raz jeszcze to nadrzędnego celu przedstawionego cyklu, omawia skrótowo poszczególne etapy badań, łącząc je w spójną całość schematycznie zilustrowaną na dwóch rycinach.

Dorobek publikacyjny obejmuje 11 publikacji o łącznym IF = 66, 935 i sumarycznej liczbie cytowań 93 (wg bazy Web of Science z dn. 13 marca 2022 r.), świadczący o aktywnym i wyróżniającym się udziale Doktorantki w pracach Zespołu.

Ogólnie rozprawę przygotowano bardzo starannie. Jest napisana ładnym i prawie bezbłędnym językiem - znalazłam tylko pojedyncze błędy literowe, których ze względu na znikomą ilość, nie będę wymieniać.

W kwestii metodycznej, prosiłabym o wyjaśnienie, którego nie udało mi się doszukać w pracy, **dlaczego analizy dotyczące sygnalizacji FGFR1 przeprowadzane były w mysiej (nie ludzkiej, jak reszta doświadczeń) linii komórkowej.**

Podsumowując, pragnę podkreślić imponującą pracę, jaką wykonała Doktorantka. Nowatorskie rozwiązania postawionego problemu poparte ogromem badań z zastosowaniem szerokiego wachlarza wysoce specjalistycznych i nowoczesnych technik znalazły odzwierciedlenie w poziomie czasopism naukowych, w których opublikowane zostały prace cyklu. Przedstawione wyniki posiadają dużą wartość poznawczą, nie tylko poszerzają naszą wiedzę na temat ważnych mechanizmów rządzących kancerogenezą, ale co istotne, stanowią podstawę i inspirację do dalszych badań mogących w sposób znaczący przyczynić się do udoskonalenia obecnych strategii terapeutycznych w onkologii. Ciągąc dalej tę myśl, moje ostatnie pytanie do Doktorantki - **jaki problem badawczy, który wyłonił się z Pani badań uważa Pani za najbardziej zasługujący na wyjaśnienie w najbliższej przyszłości?**

Reasumując, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Marty Joanny Poźniak spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w odpowiednich przepisach, a dorobek naukowy Kandydatki w pełni uzasadnia nadanie stopnia doktora nauk.

Tym samym zwracam się do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Marty Joanny Poźniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wskazując na wysoką wartość merytoryczną uzyskanych wyników i aktywność publikacyjną Doktorantki składam wniosek o wyróżnienie rozprawy.

PROFESOR UCZELNI
Zakładu Patologii Katedry Onkologii
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
H. H. Romanowska-Knight
Dr hab. n. med. Hanna Romanowska-Knight