



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Zakład Biochemii Komórki

Kierownik

Prof. dr hab. Joanna Bereta

Recenzja rozprawy doktorskiej pani mgr Marty Joanny Poźniak pt. „Modulacja działania receptora 1 czynników wzrostu fibroblastów poprzez kontrolę dystrybucji tego receptora na powierzchni komórek”

Praca doktorska pani mgr Marty Joanny Poźniak została wykonana na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego w Zakładzie Inżynierii Białka. Promotorem pracy jest dr hab. Łukasz Opaliński.

Rozprawę doktorską pani mgr Poźniak stanowi zbiór spójnych tematycznie pięciu wieloautorskich publikacji, w tym jednej pracy przeglądowej. We wszystkich publikacjach pani mgr Poźniak jest pierwszą i wiodącą autorką, a promotor, dr hab. Łukasz Opaliński autorem korespondencyjnym. Przedstawiona do oceny rozprawa zawiera dodatkowo streszczenie, jasno postawiony cel pracy, krótkie ogólne wprowadzenie i podsumowanie napisane w języku polskim. Świetnym pomysłem było także poprzedzenie każdej publikacji krótkim wprowadzeniem do tej konkretnej pracy.

Głównym przedmiotem badań Doktorantki, modelową dla niej cząsteczką, był receptor 1 czynników wzrostu fibroblastów. Jednakże, wyniki opublikowanych przez nią badań mają bardziej uniwersalne znaczenie. Zarówno obserwacje dotyczące zależności endocytozy receptorów od stopnia ich oligomeryzacji, jak i stworzone przez Doktorantkę narzędzia wymuszające tworzenie klastrów receptorów mogą być wykorzystane przez naukowców zajmujących się różnymi białkami pod kątem czysto poznawczym, ale także pod kątem możliwości terapeutycznego ich wykorzystania.

Z pewnością fakt, że członkowie Zespołu, w którym Doktorantka znalazła swoje miejsce, są w światowej czołówce naukowców zajmujących się biologią czynników FGF i ich receptorów oraz są specjalistami z dziedziny biochemii i inżynierii białek, w tym przeciwciał, pomógł pani mgr Poźniak w rozwoju naukowym i w osiągnięciu, a sędzę, że i w przekroczeniu, pierwotnie założonych celów pracy. Jednakże jej osobista praca nad projektem, którego wyniki znalazły się w rozprawie doktorskiej zdaje się być nie do przecenienia.

W mojej opinii najważniejszymi osiągnięciami projektu doktorskiego są:

1. Stworzenie cząsteczki T-Fc zawierającej cztery miejsca wiązania receptora FGFR1 (w postaci scFv), powodującej oligomeryzację receptora bez jego aktywacji i powodującej wzmożoną endocytozę receptora szlakiem zależnym i niezależnym od klatryny i w konsekwencji stwierdzenie, że nasilenie endocytozy zależnej od receptora nie wymaga jego aktywacji (publikacja 2).
2. Stworzenie, na bazie T-Fc, cząsteczki sprzęgniętej z silnym lekiem cytostatycznym (pochodną aurystatyny), która, dzięki wzmożonej endocytozie zależnej od FGFR1, wywołuje śmierć komórek z nadekspresją tego receptora. Taka cząsteczka mogłaby mieć zastosowanie w terapii nowotworów charakteryzujących się nadekspresją FGFR1. Wykorzystanie tego typu cząsteczek specyficznych w stosunku do innych antygenów nowotworowych i także wywołujących tworzenie klastrów tych białek skutkujące wzmożoną endocytozą jest warte rozważenia (publikacja 4).
3. Stworzenie, przy wykorzystaniu oligomerów GFP (ang. *GFP-(nano)-polygons*) w fuzji ze streptokokowym Białkiem G, multiwalentnych kompleksów FGF1 i stwierdzenie, że losy receptora FGFR1 i stopień aktywacji komórek zależą od stopnia oligomeryzacji kompleksu aktywatorowego. Tego typu rusztowania mogłoby znaleźć zastosowanie zarówno w optymalizacji terapeutycznego pobudzania osi FGF-FGFR jak i innych receptorów (publikacja 3).
4. Stworzenie koniugatów streptawidyny z kompleksami biotynylowanego czynnika FGF1 z cytotoksyczną aurystatyną; wykazanie wybiórczej, znaczącej cytotoksyczności tych koniugatów w stosunku do komórek z nadekspresją FGFR1 oraz weryfikacja możliwości szerszego wykorzystania tego typu koniugatów (publikacja 5).

Oprócz przedstawienia osiągnięć czysto badawczych Doktorantka włączyła do pracy doktorskiej publikację przeglądową (publikacja nr 1), dotyczącą konsekwencji oddziaływań receptorów FGFR z różnymi cząsteczkami. Praca ta stanowi doskonałe wprowadzenie do prac eksperymentalnych.

Wszystkie publikacje są na bardzo wysokim poziomie naukowym. Ich rezultaty wzbogacają światową wiedzę na temat funkcjonowania receptorów błonowych i zależności pomiędzy stanem receptorów w błonie (monomer, dimer, tetramer, klaster wyższego rzędu) a ich endocytozą i aktywnością. Proponują również rozwiązania biotechnologiczne – narzędzia molekularne, które mogłyby regulować aktywność receptorów błonowych i znaleźć zastosowania w terapii chorób nowotworowych oraz być może także w medycynie regeneracyjnej.

Rolą recenzenta jest także zwrócenie uwagi na słabe punkty, niejasności czy błędy w rozprawie doktorskiej, co w przypadku doktoratów stanowiących zbiór już opublikowanych, recenzowanych i bardzo dobrych publikacji jest zadaniem trudnym. Ograniczona objętość publikacji często nie pozwala na szczegółowe opisywanie zagadnień metodologicznych, stąd prosilibym Doktorantkę o wyjaśnienie następujących kwestii:

1. Aby zbadać poziom znakowanych fluorescencyjnie kompleksów wewnątrz komórki po endocytozie, stosowano m.in. cytometrii przepływową. Komórki przepłukiwano wzbogaconą w albuminę pożywką komórkową o pH 3,5 w celu usunięcia białek, które są związane z powierzchnią komórek, czyli jeszcze nie uległy endocytozie. Nie znalazłam informacji jak uzyskano takie pH? Czy ta metoda jest skuteczna w stosunku do wszystkich typów komórek i wszystkich białek/kompleksów potencjalnie z komórką oddziałujących? Jaką kontrolę można byłoby zastosować, aby sprawdzić własny model badawczy?
2. Proszę o wyjaśnienie wyników interferometrii biowarstwowej przedstawionych w publikacji nr 5 w tabeli – Fig. 4F. Dlaczego do analizy zastosowano model „*global fitting with the 2:1 heterogeneous ligand*” i o czym konkretnie świadczą dwie podane w tabeli wartości K_D , k_{on} i k_{off} dla każdego z badanych kompleksów?
3. Koniugacja pochodnej aurystatyny z łącznikiem walilo-cytrulinowym do łańcuchów białkowych była przeprowadzona za pośrednictwem maleimidu – do grup -SH. Przed koniugacją mostki disulfidowe pomiędzy łańcuchami immunoglobulinowymi zostały zredukowane i wg opisu i rysunku właśnie one służyły jako miejsce przyłączenia aurystatyny. Czy i w jaki sposób zapewniono wybiórcze przyłączanie aurystatyny do tych miejsc? Domeny CH2 i CH3 immunoglobulin mają po jednym mostku disulfidowym.

Inne uwagi:

4. W Dyskusji w publikacji nr 3 znalazłam następujące stwierdzenie (cytuję): *Although the engineered expression constructs are equipped with a functional signal peptide directing Fc-FGF1 and FGF1-Fc to the secretory route, it is likely that the intrinsic ability of FGF1 to employ unconventional secretion mechanisms partially outcompetes the ER targeting.* Tu Autorzy publikacji (a więc również Doktorantka) powołują się na publikację pochodzącą z własnego Zakładu: *High-Affinity Internalizing Human scFv-Fc Antibody for Targeting FGFR1-Overexpressing Lung Cancer, Sokolowska-Wedzina i wsp.* Autorzy stawiają hipotezę, że białka fuzyjne zawierające FGF1 trafiają do cytozolu. Taki scenariusz tłumaczyłby nie w pełni efektywne wydzielanie rekombinowanych białek Fc-FGF1 i FGF1-Fc. Po pierwsze, nie znalazłam w cytowanej pracy wyników badań wspierających tę hipotezę. Po drugie, hipoteza wydaje mi się mało prawdopodobna. Bardzo proszę o wyjaśnienie molekularnych mechanizmów, które mogłyby prowadzić do syntezy białek fuzyjnych w cytozolu, mimo wyposażenia ich w funkcjonalny peptyd sygnałowy. Białka są kierowane do syntezy do wnętrza ER natychmiast po wyłonieniu się peptydu sygnałowego z rybosomu, zanim powstanie dalsza część białka. Przy okazji proszę Doktorantkę o króciutkie zaprezentowanie najnowszych odkryć na temat mechanizmu sekrecji FGF1 oraz o zaproponowanie alternatywnej hipotezy, która mogłaby tłumaczyć ograniczenie wydzielania syntetyzowanych białek fuzyjnych.
5. Bardzo powszechnym w całej literaturze naukowej błędem, który pojawia się również w publikacjach pani mgr Poźniak jest niewłaściwe opisywanie osi rzędnych. **Opis** osi nie ma wskazywać, co należy zrobić z liczbami na osi, aby poznać wynik eksperymentu, tylko co **oznaczają** te liczby. Jeśli nasze wyniki liczbowe odczytane z aparatu pomiarowego to 1×10^6 , 2×10^6 itd., to na osi powinno się zaznaczyć 1, 2, 3 itd., a w opisie osi np. $MFI \times 10^{-6}$, bo liczba na osi stanowi jedną milionową odczytu MFI. Łatwo to sobie uzmysławić patrząc na wykresy w skali logarytmicznej (nie logarytmujemy liczby na wykresie tylko wiemy, że liczba na wykresie to logarytm wyniku).
6. Oprócz uwag dotyczących publikacji mam również uwagę dotyczącą Wprowadzenia. Tu moją wątpliwość wzbudził następujący fragment (cytuję): *Każda komórka nowotworowa*

jest wyposażona w szeroką gamę biologicznie aktywnych cząsteczek powierzchniowych, do których należą antygeny MHC (ang. Major Histocompatibility Complex) lub HLA (ang. Human Leukocyte Antigen), receptory cytokin, cząsteczki adhezji komórkowej, receptory czynników wzrostu, cząsteczki Fas/Fas-ligand i inne. Zwiększona ekspresja tych biomarkerów jest cechą wielu nowotworów, ułatwiającą wzrost i rozprzestrzenianie się guza. Bardzo proszę o komentarz, czy nowotwory wykazują zwiększoną ekspresję antygenów MHC (znanych u człowieka jako HLA) oraz jaka jest korelacja między poziomem ekspresji antygenów HLA a wzrostem i rozprzestrzenianiem się nowotworu?

7. Po przeczytaniu bardzo ciekawej pracy przeglądowej stanowiącej część rozprawy chciałabym poznać opinię pani mgr Poźniak na temat pojęcia „ligandy receptorów z rodziny FGF”. Jak by Pani zdefiniowała to pojęcie? Czy do tej grupy zakwalifikowałaby Pani jedynie białka z rodziny FGF, czy może także inne białka zdolne do aktywacji FGFR? L1-CAM? N-CAM? Neuroplastynę Np55, nektynę-1, kadherynę-11 i ew. inne?
8. Uwagi językowe. Autorka we fragmentach rozprawy pisanych w języku polskim wprowadza skrót FGFRs odnoszący się do receptorów czynników FGF. Jest to skrót należący całkowicie do języka angielskiego i sprzeczny z zasadami obowiązującymi w języku polskim. Mamy przecież w języku polskim nasze własne skrótowce, które można swobodnie stosować i odmieniać przez przypadki. Proponowałabym stosowanie skrótu FGFR-y, FGFR-ów, o FGFR-ach itp. W języku polskim należy pisać tak, aby tekst można było przeczytać na głos bez wyraźnego zgrzytu i odczucia, że „coś tu nie brzmi”. Druga, nieco podobna uwaga dotyczy wprowadzonego w polskim tekście terminu GFPpolygons. Jeden problem to końcówka „s”, o której już pisałam. Ale problem stanowią też kolejność słów GFP i polygon, brak w języku polskim terminu „polygon” (tu mamy wielokąt) i zupełnie różne znaczenie przychodzącego na myśl słowa „poligon”. Gdyby przyszło Pani pisać lub mówić na ten temat w języku polskim proponuję albo po prostu stosować termin „oligomery GFP” (termin, który także stosują autorzy cytowanej przez Autorkę publikacji) ew. wprowadzenie terminu „wielokąty GFP” lub „nanowielokąty GFP”.
9. Drobniejsze uwagi językowe to stosowanie terminu: „nadekspresjonujące” lub (gorzej) „nadekspresujące”. Ładniej brzmi: „komórki z nadekspresją” albo „charakteryzujące się nadekspresją”. Pokładać nadzieję łączy się z miejscownikiem (w czym? w rozwoju a nie: w co? w rozwój). Według *Uniwersalnego słownika języka polskiego PWN*, dopełniacz od ligand brzmi: liganda a nie ligandu (niektórzy językoznawcy nie są w przypadku odmiany kategoriyczni). Autorka stosuje obie formy. Muszę przyznać, że oprócz tych kilku niedoskonałości, Autorka pisze ładnym, żywym, naukowym językiem polskim.

Kwestie formalne: Autorka przy każdej publikacji podaje informację o swoim procentowym w niej udziale.

We wszystkich publikacjach jest to udział sześćdziesięcioprocentowy. W samych publikacjach można znaleźć informację, że pani mgr Poźniak uczestniczyła w planowaniu, przeprowadzaniu i analizie eksperymentów, w opracowywaniu wyników i w pisaniu wszystkich pierwszych i ostatecznych wersji manuskryptów. Brakuje mi jednak informacji, czy Doktorantka uczestniczyła we wszystkich typach eksperymentów? Czy zdobyła doświadczenie we wszystkich technikach stosowanych w przedstawionych publikacjach? Taką informację można było zawrzeć w suplemencie do rozprawy.

Druga, już zupełnie trzeciorzędna uwaga, dotyczy podawania danych bibliometrycznych. Niestęchanie szybki rozwój nauki powoduje to, że coraz częściej ocenia się dorobek naukowców na podstawie liczby publikacji, liczby cytowań i współczynników oddziaływania czasopism, w których prace zostały opublikowane. Brakuje czasu na wnikliwe czytanie publikacji, a stopień specjalizacji zawęża grono osób, które mogłyby rzetelnie ocenić merytorycznie czyjś dorobek. Większość naukowców zdaje sobie sprawę, jak ułomny jest to system. Praca kontrowersyjna oparta na błędnych założeniach może być wielokrotnie cytowana, a znakomita publikacja z niszowej dziedziny może być cytowana sporadycznie. Jeśli jednak decydujemy się na podawanie liczby cytowań własnych publikacji, to warto zaznaczyć także liczbę cytowań bez autocytowań. Na tę uwagę nie oczekuję odpowiedzi w czasie obrony.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pani mgr Marty Poźniak spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). Wnioskuje zatem do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie pani mgr Marty Poźniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na bardzo wysoki poziom naukowy składających się na rozprawę publikacji i doskonałe połączenie tych publikacji w jedną spójną całość składam wniosek o wyróżnienie rozprawy.

