

Wrocław, 2022-07-11

Prof. dr hab. Arkadiusz Miązek
Kierownik Laboratorium Immunologii Nowotworów
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Marty Joanny Poźniak pt. „Modulacja działania receptora 1 czynników wzrostu fibroblastów poprzez kontrolę dystrybucji tego receptora na powierzchni komórek” zrealizowanej w Zakładzie Inżynierii Białka, Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem promotora, profesora Łukasza Opalińskiego.

1. Ocena formalna:

Podstawę wykonania recenzji stanowi uchwała nr 39/2022 Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego dnia 21 kwietnia 2021 roku. Na przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską składa się cykl pięciu publikacji (w tym jednej przeglądowej i 4 doświadczalnych) z listy JCR o łącznym współczynniku oddziaływania IF równym 32,661 i punktacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego równej 580 punktów. Tekst dysertacji składa się z 159 numerowanych stron maszynopisu w oprawie twardej, podzielonych na następujące części: spis treści (s.5), streszczenie (s.7-8), abstract (s.9), wprowadzenie (s.10-15), cel pracy (s.16), teksty pięciu publikacji poprzedzone streszczeniami (s.17-127), podsumowanie (s.128-133), bibliografia (s.134-140), dorobek naukowy (s.141-142), spis rysunków (s.143), suplementy (s.144-159). Dodatkowo, na nienumerowanych stronach zamieszczono oświadczenia o procentowym udziale współautorów 5 publikacji stanowiących cykl w ich powstanie. Oświadczenia te są każdorazowo podpisane przez autora korespondencyjnego oraz Doktorantkę.

Najważniejszym celem oceny formalnej rozprawy doktorskiej ze współautorskiego cyklu publikacji jest określenie indywidualnego wkładu Doktorantki w ich przygotowanie. Uważam, że jakkolwiek 60 procentowe określenie udziału Doktorantki w przygotowaniu wszystkich publikacji cyklu jest pewną miarą Jej zaangażowania w ich powstanie i formalnie na takiej podstawie można uznać wiodący Jej udział, to jednak według mnie, większą wartość przedstawiają opisy konkretnych działań Doktorantki, które przyczyniły się do powstania publikacji. W tym kontekście bardziej informatywne wydają się zarówno krótkie streszczenia

poszczególnych publikacji cyklu (s. 17, 47, 73, 90, 105), w których Doktorantka przedstawia jakie prace wykonała osobiście oraz oświadczenia współautorów zamieszczone na końcu poszczególnych opublikowanych prac (s. 31, 69, 88, 102, 125) z których jasno wynika, że Doktorantka zaprojektowała i wykonała większość doświadczeń, przeanalizowała statystycznie i zinterpretowała otrzymane wyniki, współuczestniczyła w przygotowaniu rycin oraz pisaniu wersji roboczych manuskryptów. We wszystkich publikacjach Doktorantka jest też pierwszą współautorką, co zwyczajowo wyraża Jej wiodącą rolę w ich powstaniu. W mojej ocenie nie ulega wątpliwości, że indywidualny wkład pracy Doktorantki w sposób kluczowy przyczynił się do powstania przedstawionego cyklu publikacji. Nie sposób jednak w tym miejscu nie wymienić jakże istotnej choć formalnie pomocniczej roli pozostałych współautorów publikacji, a szczególnie promotora, prof. Łukasza Opalińskiego, który w ramach prestiżowego programu „First TEAM” Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej uzyskał finansowanie i prowadzi nowatorskie badania nad nowymi strategiami leczenia nowotworów opartymi o leki biologiczne, których częścią jest przedstawiony do recenzji cykl prac. Warto także podkreślić istotną rolę grupy badaczy z Zakładu Inżynierii Białek UW r stworzonego i kierowanego przez prof. Jacka Otlewskiego, którego przełomowe odkrycia dotyczące struktury czynnika wzrostu fibroblastów (FGF1) i osi sygnalizacji przez receptor FGFR1 stworzyły wręcz idealne warunki merytoryczne i warsztatowe sprzyjające rozwojowi naukowemu i doskonaleniu umiejętności Doktorantki.

Zdolności Doktorantki do syntetycznej prezentacji założeń i wyników badań naukowych oraz do formułowania wniosków wypływających z przeprowadzonych prac dobrze ilustrują rozdziały pomocnicze dysertacji, do których zalicza się wprowadzenie i podsumowanie. W rozdziałach tych, które co warto podkreślić, są bardzo starannie edytowane oraz napisane dobrą polszczyzną, Doktorantka przedstawia stan wiedzy dotyczący przedmiotu dysertacji w momencie podejmowanych przez Nią badań oraz wskazuje hipotezy sprawdzane w ramach poszczególnych publikacji cyklu. W rozdziałach tych Autorka wskazała i omówiła także najważniejsze osiągnięcia badawcze dysertacji i przedstawiła perspektywę dalszego rozwoju opracowanych technologii. Rozdziały te są ilustrowane czterema rysunkami poglądowymi oraz zawierają 77 odnośników do aktualnej literatury przedmiotu. Świadczą one o dobrym opanowaniu przez Doktorantkę sztuki pisania tekstów naukowych w języku polskim.

Cele projektu doktorskiego zostały sformułowane w sposób jasny. Wyszczególniono trzy cele szczegółowe odnoszące się bezpośrednio do wykonanych prac. Podsumowując ocenę formalną rozprawy doktorskiej stwierdzam, że spełnia ona wszystkie kryteria zwyczajowo przyjęte dla tego typu opracowań.

2. Ocena merytoryczna:

Przedmiotem rozprawy było wytworzenie oraz ocena właściwości nowych, multimerycznych ligandów receptora 1 czynników wzrostu fibroblastów (FGFR1) w kontekście poznania mechanizmów jego transportu komórkowego, szczególnie w komórkach nowotworowych. Receptor FGFR1, należy do rodziny receptorowych kinaz tyrozynowych i jest obecny na powierzchni wielu typów prawidłowych komórek ssących pełniąc istotną funkcję zarówno podczas rozwoju płodowego (organogeneza mózgu, kończyn, płuc, gruczołów sutkowych) jak i w życiu osobniczym, w procesach angiogenezy, regeneracji tkanek, czy zapaleniu [<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.02.018>]. Co istotne dla obecnej rozprawy doktorskiej, zaburzenia szlaku przekazywania sygnałów przez FGFR, najczęściej wywołane amplifikacją genu obserwuje się w około 7% procentach różnych nowotworów, z czego około 49% dotyczy amplifikacji genu *FGFR1* co czyni go trzecim, najczęściej ulegającym mutacjom genem związanym ze szlakami przekazywania sygnałów w nowotworach po *TP53* i *KRAS* [<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.02.018>]. Nadekspresja FGFR1 w komórkach nowotworowych przyczynia się do wzmożenia ich aktywności podziałowej oraz promuje przeżycie w środowisku guza. W tym kontekście FGFR1 jest atrakcyjnym celem eksperymentalnych terapii przeciwnowotworowych. Pewne sukcesy na tym polu notuje się jednak dotychczas głównie w podejściach bazujących na hamowaniu aktywności enzymatycznej FGFR1 przez małowcząsteczkowe inhibitory o mniej lub bardziej zawężonym spektrum działania (np. Nintedanib, <https://doi.org/10.1007/s11523-015-0367-8>) oraz eksperymentalnej terapii polegającej na wychwycie ligandów FGFR1 poprzez rekombinowany fragment FGFR1 w fuzji z regionem Fc ludzkiej immunoglobuliny IgG1 (FP-1039, DOI: 10.1126/scitranslmed.3005414). Odmienne podejście zaproponowała Doktorantka w artykule opublikowanym na łamach czasopisma **Molecular Oncology 14 (2020)**, w którym w celu modulacji poziomu ekspresji receptora FGFR1 wytworzyła tetrawalentny i bispecyficzny jego ligand nazwany T-Fc, złożony z 4 fragmentów scFv przeciwciała swoistego dla domeny D1 receptora FGFR1 w fuzji z regionem Fc ludzkiej immunoglobuliny IgG1. Charakterystyka wiązania ligandu T-Fc do receptora FGFR1 stanowiła moim zdaniem punkt zwrotny projektu doktorskiego ponieważ okazało się, że oligomeryzacja receptora FGFR1 przez oddziaływanie z cząsteczką T-Fc powoduje znaczące, pięciokrotne przyspieszenie jego internalizacji. Dalsze, znakomicie zaplanowane eksperymenty, wykonane między innymi we współpracy z prof. Miączyńską, ekspertką w dziedzinie endocytozy, wykazały że zarówno klatrynozależne ale co istotne także klatrynoniezależne mechanizmy biorą udział w przyspieszeniu endocytozy

FGFR1 na skutek jego oligomeryzacji. Tak znamienita obserwacja doczekała się wkrótce praktycznego zastosowania opisanego w artykule w **Molecular Medicine 27:46 (2021)**, w którym Doktorantka wytworzyła i zbadała właściwości cytotoksyczne koniugatu cząsteczki T-Fc z auristatyną nazwaną T-Fc-vcMMAE wobec szeregu linii nowotworowych. Oprócz wykazania braku nieswoistej cytotoksyczności powyższego koniugatu wobec linii komórkowych niewykazujących ekspresji powierzchniowej cząsteczki FGFR1, Autorka dowiodła, że koniugat T-Fc-vcMMAE zabija większość badanych linii nowotworowych proporcjonalnie do poziomu ekspresji FGFR1 (z EC_{50} w zakresach nanomolowych) z wyjątkiem linii ludzkiego raka płuca COLO-699, która pomimo silnej ekspresji FGFR1 była niewrażliwa na zastosowany koniugat. W dwóch pracach opublikowanych w czasopismach **Biomolecules 11, 1088 (2021)** oraz **J. Biomedical Science 28:69 (2021)** Doktorantka, bazując na koncepcji oligomeryzacji receptora FGFR1 powodującej przyspieszenie jego internalizacji, opisuje dwie inne strategie (platformy technologiczne) tworzenia odpowiednio, multimerycznych i oligomerycznych ligandów (na przykładzie FGF1), które mogłyby być uniwersalnie stosowane do tworzenia koniugatów cytotoksycznych lub fluorescencyjnych, wykorzystywanych w diagnostyce lub eksperymentalnych terapiach przeciwnowotworowych. W publikacji w **Biomolecules 11, 1088 (2021)** Autorka dokonuje dodatkowo ciekawej obserwacji hamowania internalizacji FGFR1 przez zastosowanie trimerycznych, tetramerycznych i pentamerycznych konstrukcji o nazwie GFPpolygons sprzęgających jednocześnie więcej niż cztery cząsteczki FGFR1 za pomocą oddziaływań z FGF1. Ta obserwacja sugeruje istnienie wartości granicznej dla jednocześnie sprzęganych cząsteczek FGFR1, które są w stanie podlegać internalizacji i może mieć, jak zaznacza Autorka, zastosowania medyczne (np. w gojeniu ran). Czy wywołanie wzmożonej sygnalizacji przez takie poly-sygnałosomy nie indukuje śmierci komórkowej?

Podsumowując ocenę merytoryczną cyklu publikacji składającego się na rozprawę doktorską nie sposób nie podkreślić ogromu wykonanej w ramach tego projektu doktorskiego pracy. Wychodząc od oryginalnej obserwacji wzmożenia internalizacji receptora FGFR1, udokumentowanej na łamach bardzo dobrze przyjętej przez środowisko naukowe publikacji w *Molecular Oncology* (2020), Doktorantka wykazała biegłość w zastosowaniu technik inżynierii białek tworząc cytotoksyczne koniugaty oraz opracowując uniwersalne platformy ekspresji białek mogące znaleźć zastosowanie w eksperymentalnych terapiach przeciwnowotworowych. Umiejętności które nabyła podczas projektu doktorskiego czynią z Niej bardzo wartościowego specjalistę w dziedzinie, którą reprezentuje.

Poniżej przedstawiam kilka komentarzy i pytań do Doktorantki, które mogą być zacznem do publicznej dyskusji nad Jej dysertacją:

Według mnie ciekawym, lecz niepodjętym przez Autorów cyklu prac aspektem badań nad FGFR1 byłoby sprawdzenie czy poszczególne sposoby oligomeryzacji tego receptora (tj. przez zastosowanie fragmentów scFv swoistych wobec domeny D1 lub fragmentów opartych na naturalnym ligandzie FGF1) wywoływałyby równocenne obniżenie tempa proliferacji komórek nowotworowych? Wszak oligomeryzacja przez związanie FGF1 wywoła kaskadę sygnalizacji promującą podziały komórkowe, a zastosowanie T-Fc nie powinno wywołać tego efektu. W świetle obserwacji wzmożonej internalizacji FGFR1 wykazanej na komórkach linii kostniakomięsaka U2OS transfekowanej genem *FGFR1*, czy inne linie nowotworowe lub komórki nienowotworowe (np. fibroblasty myszy NIH3T3) także internalizowałyby konstrukcję T-Fc szybciej niż B-Fc? Jak można byłoby wytłumaczyć oporność linii COLO-699 na koniugat cytotoksyczny T-Fc-vcMMAE. Czy wszystkie postulowane mechanizmy endocytozy zaangażowane w internalizację FGFR1 byłyby w tej linii nieaktywne? Czy może ta linia niesie mutację w domenie D1 FGFR1, która nie pozwala na przyłączenie T-Fc? Czy zatem koniugat MMAE-FGF1E-SA-4A zabiłby tę linię?

3. Podsumowanie:

Podsumowując, przedstawiony mi do recenzji, spójny tematycznie cykl pięciu prac opublikowanych w czołowych czasopismach z listy Filadelfijskiej o zasięgu międzynarodowym, stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę Doktorantki oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia przez Nią badań naukowych. Wartość naukowa tego cyklu publikacji jest znacząca, a wyniki badań przyczyniają się do postępu w dyscyplinie naukowej reprezentowanej przez Doktorantkę.

4. Wniosek końcowy:

W mojej ocenie przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska z nawiązką spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.).

Dlatego przedkładam wysokiej Radzie Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego wniosek o dopuszczenie mgr Marty Joanny Poźniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na wartość merytoryczną publikowanych prac Doktorantki wnioskuję o wyróżnienie tej rozprawy stosowną nagrodą.



Arkadiusz Miązek