

Prof. Piotr Młynarz  
Katedra Biochemii,  
Biologii Molekularnej i Biotechnologii  
Wydział Chemiczny  
Politechnika Wrocławska  
Wybrzeże Wyspiańskiego 27  
50-370 Wrocław

Wrocław, 23.09.2023 r.

## **Recenzja**

### **rozprawy doktorskiej Pani mgr Darii Nawrockiej, zatytułowanej: „Aktywność biologiczna kowalencyjnych dimerów ludzkiego czynnika wzrostu fibroblastów 2 (FGF2)”**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska była zrealizowana pod kierunkiem Pana Profesora Jacka Otlewskiego w Zakładzie Biotechnologii Białek, w którym od lat prowadzone badania nad różnego rodzaju białkami są rozpoznawalne zarówno w kraju jak i za granicą.

Coraz większa liczba dopuszczonych do terapii biofarmaceutyków stanowi niewątpliwie przełom w leczeniu chorób onkologicznych. Niestety pomimo wielu prób i pomysłów na stworzenie wielofunkcyjnych konstruktów, które mogłyby być zastosowane do terapii celowanych i spersonalizowanych, medycyna ciągle nie dysponuje koniugatami o wysokiej selektywności, specyficzności i skuteczności, które dodatkowo nie posiadałyby efektów ubocznych. Dzieje się tak ze względu na wiele czynników związanych z rozwojem guza, brakiem jego homogeniczności oraz różnego rodzaju receptorami, które występują na powierzchni komórek rakowych. Dodatkowym czynnikiem, który odgrywa ogromną rolę jest zawsze odpowiedź organizmu na wprowadzone farmaceutki. Podobnie w przypadku chorób zapalnych istnieje ograniczona liczba dostępnych medykamentów. Z tego względu uważam, że tematyka podjęta w niniejszej pracy doktorskiej, która była zapoczątkowana na początku XXI wieku jest bardzo aktualna, a opisane w pracy rezultaty badań przyczyniają się bez wątpienia do jej rozwoju.

Przedstawiona do oceny dysertacja doktorska jest napisana w formie hybrydowej, to znaczy praca zawiera rozdziały wprowadzające takie jak „Streszczenie” w języku polskim i angielskim, „Wprowadzenie”, „Cel pracy”, następnie prace oryginalne „Publikacja I”, „Publikacja II” oraz z rozdziały końcowe, czyli „Podsumowanie”, „Bibliografie” i „Dorobek naukowy”. Jest to sposób pisania dysertacji doktorskich, który jest w ostatnich latach bardzo powszechny. Świadczy on o bardzo dobrym zaplanowaniu eksperymentów wykonanych podczas realizacji pracy doktorskiej oraz dużym zaangażowaniu Doktorantki w jej realizację. Chociaż nie do przecenienia jest oczywiście rola promotora.

Streszczenie napisane w dwóch językach polskim i angielski przedstawia w skondensowany sposób wprowadzenie do tematyki pracy doktorskiej, jej cel i zakres podjętych prac. Następny rozdział „Wprowadzenie” pozwala czytelnikowi na zapoznanie się ze wszystkim niezbędnymi aspektami związanymi z czynnikiem wzrostu fibroblastów 2

(FGF2), charakterystyką receptora FGFR1, jako celu molekularnego w ukierunkowanych terapiach przeciwnowotworowych oraz opisem molekuł stosowanych w terapiach ukierunkowanych. Jest to moim zdaniem dobrze napisany wstęp do dysertacji umożliwiający czytelnikowi zrozumienie założeń pracy i podjętej problematyki badawczej. Następnym rozdziałem jest „Cel pracy”, który obejmuje zbadanie wpływu dimeryzacji FGF2 na jego biologiczny potencjał. Dodatkowo na to zadanie badawcze składają się dwa szczegółowe cele. Pierwszym jest uzyskanie kowalencyjnych dimerów, rekombinowanych wariantów FGF2 wraz z ich charakterystyką biofizyczną i biologiczną. Natomiast drugim z szczegółowych celów zakładał wykorzystanie opracowanej cząsteczki celującej w FGFR1, jako nośnika dla dwóch niezależnych pod względem działania cytostatyków - monometylo aurystatyny E (MMAE) oraz  $\alpha$ -amanityny ( $\alpha$ AMTN) wraz z oceną cytotoksyczności i selektywności otrzymanych koniugatów.

Następnie Doktorantka przedstawiła swoją pierwszą pracę wraz z wprowadzeniem do niej, zatytułowaną: „*Stable Fibroblast Growth Factor 2 dimer with High Pro-Survival and Mitogenic Potential*” opublikowaną w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences*. W niniejszej publikacji została opisana metoda syntezy 8 dimerycznych koniugatów FGF2. W tym celu jako grupy wiążące zostały wykorzystane reszty cysteinowe, które znajdowały się na końcu N lub C, lub natywnie występująca w sekwencji reszta C96. Dla opisu biofizycznych zsyntezowanych dimerów Doktorantka wykorzystwała szereg metod używanych w laboratoriach chemicznych i biochemicznych w tym chromatografię, spektroskopię fluorescencyjną oraz spektrometrię mas. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń Autorka dysertacji dowiodła pozytywny wpływ dimeryzacji na aktywność promitogenną oraz wzrost stabilności FGF2. Podobnie został zaobserwowany pozytywny wpływ dimeryzacji FGF2 na zwiększone właściwości anty-apoptotyczne użytych układów molekularnych. W teście gojenia ran, również koniugaty dimeryczne wykazały większy potencjał stymulujący, niż formy monomeryczne. Ciekawą obserwacją były różnice w kinetyce i wydajności internalizacji otrzymanych koniugatów, gdzie determinującymi parametrami były wzajemne położenia cząsteczek FGF2 względem siebie oraz wybór łącznika. W tym miejscu chciałbym zapytać Panią mgr Darię Nawrocką, czy w świetle otrzymanych wyników nie byłoby celowym stworzenie zoptymalizowanych polimerowych koniugatów białkowych, które mogłyby jeszcze bardziej wydajnie oddziaływać z receptorami FGFR1.

Druga z prac zatytułowana „*Dual-Warhead Conjugate Based on Fibroblast Growth Factor 2 Dimer Loaded with  $\alpha$ -Amanitin and Monomethyl Auristatin E Exhibits Superior Cytotoxicity Towards Cancer Cells Overproducing Fibroblast Growth Factor Receptor 1*” opublikowana w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* stanowi drugi etap podjętych wcześniej badań. Został w niej zaproponowany dimeryczny nośnik leków dla dwóch cytostatyków  $\alpha$ -amanityny ( $\alpha$ AMTN) oraz monometylo aurystatyny E (MMAE). Na bazie rezultatów z pierwszej pracy został zaprojektowany i wytworzony w bakteryjnym systemie ekspresyjnym dimer z sekwencją GGSKSK na końcu C oraz z sekwencją KCKSGG na końcu N. Oba monomery posiadały punktowe mutacje C78S oraz C96S. Jako linker do połączenia monomerów w dimer, zamiast łącznika PEG, Doktorantka zastosowała elastyczny peptyd (SGG)<sub>11</sub>. W celu przyłączenia cząsteczek cytostatyków metodą ligacji

z wykorzystaniem dwóch enzymów ligazy Snoop oraz Sortazy A, zostały wprowadzone dwie specyficzne sekwencje peptydowe. Natomiast otrzymany fragment cząsteczki cytostatyku zawierał dwa miejsca, w których mógł być on odłączony od konstruktów, dipeptyd walina-cytrulina oraz fragment *p*-aminobenzylkarbaminianowy. Oprócz cząsteczki dimeru zawierającego dwa różne cytostatyki otrzymano również ich analogii monomeryczne. W dalszej części pracy zostały przeprowadzone badania wszystkich otrzymanych konstruktów, w tym form monomerycznych w postaci ekwimolarnej oraz nieskoniugowanych cytostatyków na 5 liniach komórkowych (HCC95, NCI-H520, NCI-H1581, JIMT-1, G292). Spośród wszystkich badanych systemów molekularnych najlepsze wyniki dotyczące ich cytotoksyczności zostały uzyskane dla otrzymanego dimeru, który zawierał oba przyłączone cytostatyki, nie biorąc oczywiście pod uwagę nieskoniugowanej MMAE (która z powodu bardzo silnej cytotoksyczności nie może być stosowana samodzielnie). Dla 4 z 5 linii komórkowych została wykazana większa internalizacja makromolekuły dimerycznej. W ramach pytań do Doktorantki chciałbym poprosić Pani mgr Darię Nawrocka, aby odniosła się do hipotezy stworzenia dimeru z podwójnie przyłączonymi cząsteczkami MMAE.

Przedstawiona do oceny dysertacja doktorska zawiera dwa znaczące osiągnięcia, pierwsze dotyczy wyników, które zostały już zawarte w publikacjach, czyli na drodze przyczynowo–skutkowej opracowanie dimerycznego konstruktów bazującego na oddziaływaniach receptora FGFR1 z czynnikiem wzrostu fibroblastów FGF2. Drugim osiągnięciem jest opanowanie przez Autorkę dysertacji warsztatu biochemiczno-biotechnologicznego wraz ze wszystkim metodami wymienionymi w pracy począwszy od ekspresji białek, syntezy lub koniugacji enzymatycznej cząsteczek, w tym makromolekuł, poprzez ich oczyszczanie, aż do metod badań na komórkach oraz obrazowaniu molekularnym. Całościowy dorobek naukowy Pani mgr Darii Nawrockiej zawiera 6 publikacji w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, z czego jak już wcześniej wymieniłem 2 wchodzi w skład niniejszej dysertacji doktorskiej.

Na koniec recenzji dodam, że nie mam w zwyczaju, wymieniać jakichkolwiek błędów językowych, czy edytorskich, czego i w tym wypadku nie zamierzam czynić, ponieważ nie wpływają one na merytoryczną zawartość pracy.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Darii Nawrockiej spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określonym w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z 18 kwietnia 2003 z późniejszymi zmianami i uzupełnieniami) oraz art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669, z późn. zm.) i wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.