



Gdańsk, 6 lipca 2022

Instytut Biotechnologii Medycznej
i Onkologii Doświadczalnej
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Dębinki 1
80-210 Gdańsk
tel. 58 349 15 85
rafal.sadej@gumed.edu.pl

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Natalii Porębskiej zatytułowanej:
„Regulacja przestrzennej dystrybucji receptora 1 czynników wzrostu fibroblastów przez
multimeryczne ligandy oparte o motywy coiled-coil oraz oligomeryczne warianty GFP”
wykonanej na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego**

W skład rodziny FGFR wchodzi cztery (FGFR1-4) przez błonowe receptory zawierające wewnątrzkomórkową domenę o aktywności kinazy tyrozynowej, których aktywacja następuje w wyniku wiązania jednego z fibroblastycznych czynników wzrostu. FGFR pełnią kluczową rolę w organogenezie oraz wielu procesach fizjologicznych. Zaburzenia ich sygnalizacji będące wynikiem polimorfizmu pojedynczego nukleotydu, mutacji punktowych, amplifikacji czy nadekspresji genów *FGFR1-4* leżą u podłoża wielu chorób, w tym nowotworowych. Mutacje aktywujące w genie *FGFR1* obserwuje się w glejakach a jego amplifikację i/lub nadekspresję występują w znacznej części raków głowy i szyi, płuc czy piersi. Stąd też rozszyfrowanie precyzyjnych mechanizmów kontrolujących aktywność FGFR i zależnych od nich ścieżek sygnalizacyjnych wydaje się istotnym zagadnieniem badawczym a same FGFR stanowią cel wielu zakończonych i trwających badań klinicznych, głównie w obszarze onkologii.

Rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Porębskiej dotyczy analiz mechanizmów regulujących funkcje FGFR1, jego dystrybucję w błonie komórkowej oraz proces internalizacji. W toku prac zaprojektowano różne oligomeryczne ligandy, dzięki którym udało się kontrolować aktywację FGFR1 i jego endocytozę. Autorka otrzymała również w systemie bakteryjnym oligomeryczne białka GFPp-FGF1, które następnie koniugowała z lekiem cytotoksycznym (MMAE). Obecność białka GFP w otrzymanych oligomerycznych koniugatach pozwalała na wizualizację ich losów w komórce. Dowiedziono, że koniugaty

cechowały się wysoką stabilnością w środowisku fizjologicznym i co kluczowe wykazywały wysoką toksycnością wobec komórek nowotworowych z nadekspresją FGFR1. Biorąc pod uwagę powyższe informacje stwierdzić należy, że zagadnienia realizowane w pracy doktorskiej Pani Natalii Porębskiej są aktualne, istotne z punktu widzenia poznawczego i posiadają potencjalny wymiar aplikacyjny. Praca została zrealizowana pod opieką merytoryczną dr. hab. Łukasza Opalińskiego z Zakładu Inżynierii Białka, Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Promotor pracy posiada obszerny i rozpoznawany na świecie dorobek m.in. w obrębie biologii fibroblastycznych czynników wzrostu i ich receptorów.

Recenzowana rozprawa to spójny tematycznie cykl czterech opublikowanych publikacji, jednej o charakterze przeglądowym (*Journal of Clinical Medicine*) i trzech eksperymentalnych (*Cell Communication and Signalling*, *International Journal of Biological Macromolecules*, *Biomacromolecules*). W opracowaniu zawarto również streszczenie całości pracy w języku polskim i angielskim, syntetyczne wprowadzenie do cyklu publikacji oraz zdefiniowano cel nadrzędny i cele szczegółowe całości pracy. Dodatkowo każda z załączonych publikacji poprzedzona jest wprowadzeniem do jej tematyki, krótkim opisem otrzymanych wyników i ich interpretacją. Na końcu opracowania znajduje się podsumowanie prac, spis literatury, zestawienie dorobku naukowego Doktorantki, suplement do 2. publikacji oraz oświadczenia współautorów o ich udziale w poszczególnych publikacjach. Taki układ rozprawy jest standardowy i nie budzi żadnych zastrzeżeń. Pani Natalia Porębska jest pierwszym autorem w pracach 1, 3 i 4 oraz drugim autorem w pracy 2. Jej zadeklarowany wkład to odpowiednio 60% w powstanie publikacji 1, 25% w 2, 60% w 3 i 60% w 4. Prace liczą od 6 do 10 autorów. Oczywistym jest więc, że udział Autorki w powstaniu cyklu był wiodący.

Pierwsza z załączonych prac ma charakter przeglądowy i skupia się na opisie mechanizmów internalizacji FGFR i ich sortowania do poszczególnych kompartmentów komórki w kontekście potencjalnego zastosowania terapii przeciwnowotworowych opartych o sprzęgnięte z chemioterapeutykami koniugaty rozpoznające i wiążące się do FGFR. Muszę przyznać, że będąc osobą głęboko interesującą się biologią FGFR z dużą przyjemnością czytałem tę publikację a jej lektura pozwoliła mi usystematyzować wiedzę dot. ww. zagadnień. Nie mam również wątpliwości, że taka strategia publikacyjna stworzyła Autorce bardzo dobre przygotowanie teoretyczne do realizacji zadań wchodzących w kolejne 3 opublikowane prace eksperymentalne. Za istotne uważam również, że wszystkie publikacje doświadczalne stanowią logiczny cykl, w którym wyniki i wnioski płynące z danej pracy stanowią podstawę formułowania celów kolejnej pracy. Całość stanowi więc spójne i wysoce wartościowe osiągnięcie naukowe.

Mam parę pytań i uwag do poszczególnych części opracowania.

i) Autorka kilkakrotnie wspomina, że komórki nowotworowe mogą „nadprodukować” FGFR1. Nie jestem zwolennikiem tego określenia i za trafniejszy uważam termin „nadekspresja”. Termin nadprodukcja chyba lepiej obrazuje wymuszoną ekspresję określonego genu a potem odpowiadającego mu białka w danym systemie prokariotycznym czy eukariotycznym. Trafniejszym wydawałoby się więc stwierdzenie, że istnieją nowotwory cechujące się nadekspresją *FGFR1* lub wysoką ekspresją białka FGFR1.

ii) Na stronie 9 Autorka pisze, że „mutacje identyfikowane w FGFR1 nieprawidłowej aktywności receptora”. Nazwa FGFR1 powinna być napisane kursywą bo w tym przypadku mówimy o genie.

iii) We „Wprowadzeniu” na str. 9 Autorka zauważa, że panel ścieżek sygnalizacyjnych aktywowanych przez FGFR1 jest raczej niewielki w stosunku do różnorodności wywoływanych przez nie odpowiedzi komórkowych. Autorka sugeruje, że u podstaw tej różnorodności leży regulacja stabilności kompleksów FGF-FGFR1 i inne mechanizmy regulacyjne. Warto byłoby tu wspomnieć o interakcji ścieżek FGFR-zależnych z różnymi ścieżkami sygnalizacyjnymi np. receptorów hormonów steroidowych, innych receptorów o aktywności kinazy tyrozynowych czy ścieżką sygnalizacyjną Wnt.

iv) Strona 11 – pisząc o terapiach celowanych autorka wspomina, że lek cytotoksyczny dostarczany jest do komórek nowotworowych wykorzystując obecność w ich błonie komórkowej „makrocząsteczek” - termin receptory byłby lepszy, poza tym terapie celowane nie dotyczą tylko leków cytotoksycznych i ich celi w błonie komórkowej, jest to oczywiste uogólnienie.

v) Strona 48 - PD173074 jest selektywnym a nie specyficznym inhibitorem FGFR1 (w publikacji stosowano nazewnictwo poprawne).

vi) W publikacji 2 wykazano, że galektyny regulują proces endocytozy i przestrzenną organizację FGFR1, zastosowano znakowany FGFR1 i mikroskopię oraz *ex vivo* analizowano oddziaływanie oczyszczonych galektyn z fragmentem zewnątrzkomórkowym FGFR1. Czy Autorka mogłaby zasugerować doświadczenia bardziej precyzyjnie wskazujące w komórce na tworzenie dimerów, oligomerów FGFR1? Czy galektyny mogłyby wpływać na powstawanie heterodimerów w obrębie FGFR?

vii) Dlaczego w publikacji 3 jako model badawczy do analizy wpływu oligomerów FGF1 na aktywność FGFR1 wybrano linię komórkową NIH3T3. Jak wygląda poziom ekspresji innych białek z rodziny FGFR? FGF1 może przecież aktywować inne receptory z rodziny FGFR.

W publikacji stwierdzono, że oligomeryczne warianty FGF1 indukują fosforylację FGFR1. Do detekcji fosforylacji zastosowano natomiast przeciwciała, które rozpoznają aktywację wszystkich członków rodziny FGFR.

viii) W publikacji 3 na rycinie 3A w przypadku stymulacji FGF1WT (2-50 ng) widoczny jest wyraźny spadek poziomu FGFR1. Jak Autorka to tłumaczy? Przy czasie stymulacji 15 min raczej mało prawdopodobne są zmiany w poziomie ekspresji FGFR1 czy degradacja receptora.

ix) Rycina 7 – dlaczego dodatek heparyny, będącej kofaktorem oddziaływania FGF1-FGFR1 w zasadzie nie wpływa na efekty FGF1 wobec żywotności komórek? Jak możemy to wytłumaczyć?

x) Publikacja 4, Rycina 6 – wykazano, że 3xGFPP_FGF1E_LPETGG wywiera pewien efekt pro-przeżyciowy wobec linii NCI-H1582 i G-292. Czy Autorka nie obawia się, że przy dłuższym stosowaniu potencjalnego leku typu ADC opierającego się na FGF1 indukcja proliferacji komórek, będąca wynikiem aktywności samego czynnika wzrostu, mogłaby prowadzić do oporności na tego typu terapię?

Prosiłbym również Autorkę o przedyskutowanie w trakcie obrony rozprawy doktorskiej danych dotyczących występowania galektyn w tkance nowotworowej w kontekście ekspresji w niej różnych FGF. Które efekty wobec FGFR byłyby dominujące, galektyn czy FGF? Czy znane jest znaczenie prognostyczne galektyn u chorych onkologicznych? Moje ostatnie pytanie dotyczy wyjaśnienia potencjalnej przewagi FGFR1 jako celu dla terapii wykorzystujące leki typu ADC vs. leki ADC rozpoznające HER2 czy EGFR. Czy FGFR1 może okazać się lepszym celem (np. biorąc pod uwagę dynamikę internalizacji i możliwość jej regulacji) niż inne receptory o aktywności kinaz tyrozynowych?

Podsumowując chciałbym zaznaczyć, że całość pracy przygotowana jest starannie. Manuskrypt napisany jest bardzo dobrze, język jest fachowy i logiczny. Wszystkie zagadnienia opisane są syntetycznie ale wyczerpująco. Postawione cele są ambitne, otrzymane wyniki udokumentowane bardzo dobrze a praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Sposób prowadzenia narracji jest dojrzały a ilość błędów językowych jest znikoma. Aktualność tematyki, spójność zagadnienia oraz lekkość z jaką Autorka prowadzi czytelnika przez swój projekt doktorski i otrzymane wyniki sprawiła, że lektura pracy była dla mnie dużą przyjemnością. Chciałbym również podkreślić, że w zestawieniu dorobku naukowego Doktorantka umieściła, poza ujętymi w skład rozprawy czterema publikacjami, dodatkowe siedem prac, a wszystkie z nich opublikowane są w czasopiśmie uważanych za prestiżowe. Bez wątpliwości świadczy to o dużej pracowitości Pani Natalii Porębskiej, ale również o świetnej organizacji całego zespołu w którym Doktorantka pracowała.

Moja ocena przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej mgr Natalii Porębskiej zatytułowanej: „Regulacja przestrzennej dystrybucji receptora 1 czynników wzrostu fibroblastów przez multimeryczne ligandy oparte o motywy coiled-coil oraz oligomeryczne warianty GFP” jest jednoznacznie pozytywna, a rozprawa w pełni spełnia zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim i warunki ujęte stosownymi przepisami, zawartymi w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). Wnoszę więc o dopuszczenie przez Radę Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego Pani mgr Natalii Porębskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie biorąc pod uwagę ilość otrzymanych wyników, wartość merytoryczną rozprawy udokumentowaną wysokiej jakości publikacjami wchodzącymi w jej skład oraz wiodący udział Autorki w ich powstaniu, zwracam się do Wysokiej Rady o wyróżnienie ocenianej pracy stosowną nagrodą.

dr hab. Rafał Sądej, prof. GUMed

