



**UNIwersytet Gdański**



*Prof. dr hab. Krzysztof Liberek*  
*Kierownik Zakładu Biochemii Białek*  
*Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-GUMed*  
*Uniwersytet Gdański*  
*ul. A. Abrahama 58; 80-307 Gdańsk*  
*tel. +48 58 523 6346*  
*E-mail: krzysztof.liberek@ug.edu.pl*

Gdańsk, 7.09.2020

Opinia o rozprawie doktorskiej Pani mgr Julii Aleksandry Chudzian pt. "Fragmenty przeciwciał specyficzne wobec fibroblastycznego czynnika wzrostu (FGF1) oraz jego receptora, FGFR1"

Terapie celowane, z uwagi na ich stosunkowo wysoką skuteczność oraz ograniczoną toksyczności w stosunku do zdrowych tkanek, są pożądanym, coraz powszechniejszym sposobem postępowania w leczeniu nowotworów. Ich wprowadzanie i stosowanie wymaga opracowywania nowych leków specyficznie nakierowanych na różne rodzaje nowotworów. Najczęstszym sposobem nakierowywania leku na komórki nowotworowe jest użycie przeciwciał wykazujących specyficzność wobec charakterystycznego dla danego rodzaju komórek nowotworowych antygeny. W swojej rozprawie doktorskiej mgr Chudzian przedstawia cykl doświadczeń, które mają na celu wytworzenie fragmentów przeciwciał specyficznych wobec fibroblastycznego czynnika wzrostu 1 (FGF1) oraz receptora czynnika wzrostu fibroblastów (FGFR1). Uzyskanie specyficznych przeciwciał, blokujących oddziaływanie pomiędzy FGF1 i FGFR1, jest istotne dla ewentualnego powstania leku nakierowanego na nowotwory, charakteryzujące się podwyższoną ekspresją FGFR1. Badanie przeprowadzone przez mgr Chudzian mają więc nie tylko znaczenie poznawcze, ale posiadają również wartość aplikacyjną.

Układ przedstawionej pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich. Praca opatrzona jest *Wstępem*, w części którego autorka przedstawia informacje na temat budowy i mechanizmu działania stosowanych oraz opracowywanych leków w celowanych terapiach przeciwnowotworowych. Doktorantka szczególnie skupiła się na wykorzystaniu przeciwciał

lub fragmentów przeciwciał w leczeniu nowotworów. W drugiej części wstępu doktorantka przedstawiła współczesną wiedzę na temat fibroblastycznego czynnika wzrostu 1 oraz jego receptorów, w szczególności w aspekcie udziału tych białek w powstawaniu niektórych nowotworów. Informacje zawarte we wstępie są przedstawione w sposób interesujący i są niezbędne do zrozumienia zastosowanego w pracy podejścia eksperymentalnego.

W rozdziałach *Materiały* oraz *Metody* Doktorantka rzeczowo i precyzyjnie opisuje stosowane materiały oraz procedury i techniki eksperymentalne

W rozdziale *Wyniki* Doktorantka krok po kroku przedstawia doświadczenia składające się na zastosowane podejście eksperymentalne, mające na celu otrzymanie fragmentów przeciwciał specyficznych wobec fibroblastycznego czynnika wzrostu 1 oraz jego receptora. Eksperymenty rozpoczęła od selekcji fragmentów przeciwciał scFv (jednołańcuchowe fragmenty zmienne), pochodzących z bibliotek Tomlinson I oraz J, wobec FGF1 przy użyciu techniki *phage display*. Otrzymane wybrane klony (386) doktorantka poddała analizie wykorzystując technikę ELISA, a następnie interferometrię biowarstwową. DNA trzydziestu potencjalnie najlepszych klonów doktorantka zsekwencjonowała. Na podstawie uzyskanych sekwencji wybrała klon, kodujący siedem fragmentów scFv przeciwciał. Sam proces selekcji ostatecznie użytych klonów jest dosyć enigmatycznie opisany w rozprawie. I tak, w wyniku przeprowadzenia monoklonalnej ELISY supernatantowej (ryc. 12) wybrano 51 klonów do dalszej analizy, ale na kolejnej rycinie 13, dotyczącej analizy oddziaływania przy użyciu interferometrii biowarstwowej, przedstawiono wyniki tylko dla 40 (?) klonów. Podpis pod ryciną 13 jest mało precyzyjny i pewnych informacji w nim brakuje. Wybrane klon, kodujące fragmenty przeciwciał, doktorantka nadprodukowała i oczyściła, a następnie zbadała ich właściwości biochemiczne. Między innymi analizowała oddziaływanie z FGF1 przy użyciu techniki NMR. Czy tego typu badania mogłyby doprowadzić do poznania dokładnych miejsc oddziaływania FGF1 oraz analizowanych fragmentów scFv? Pewne informacje na temat różnic w miejscach oddziaływania doktorantka uzyskała w eksperymentach interferometrii biowarstwowej. Cztery z siedmiu, według doktorantki, najbardziej interesujące fragmenty scFv zostały przeklonowane tak aby uzyskać fuzję z regionem stałym przeciwciała (format scFv-Fc). Odpowiednie białka zostały oczyszczone i ich właściwości zostały zbadane. Również w tym przypadku selekcja fragmentów scFv, które zostały przeformatowane w scFv-Fc, jest opisana bardzo skrótowo. Dlaczego doktorantka odrzuciła na tym etapie scFvE5; fragment który posiadał zdecydowanie największe powinowactwo do FGF1? Takiej informacji nie ma w tekście rozprawy. Doktorantka zbadała również zdolność zarówno fragmentów scFv jak i scFv-Fc do blokowania indukowanej przez FGF1 aktywacji receptora

FGFR1. Uzyskane wyniki pokazały, że fragmenty scFc w odróżnieniu od scFv-Fcp posiadają zdolność do blokowania aktywacji receptora FGFR1.

Drugie opisane w doktoracie podejście eksperymentalne związane jest z próbą zablokowania receptora FGFR1 przy użyciu trzech *peptibodies*, będących fuzją regionu Fc ludzkiej IgG1 oraz odpowiednich peptydów wiążących się do receptora czynnika wzrostu fibroblastów 2. Odpowiednio zaprojektowane białka zostały oczyszczone, a ich działanie doktorantka sprawdziła *in vivo* na wybranych liniach komórkowych poprzez analizę ich zdolności do blokowania szlaków sygnałowych zależnych od receptora FGF1. Jedno z analizowanych *peptibodies* wykazało znaczne obniżenie stopnia aktywacji FGFR1 oraz kinaz MAP. Należy jednak zauważyć, że w doświadczeniach przedstawionych na rycinie 24a brak jest kontroli dla komórek, które nie były stymulowane przez FGF1. Doktorantka przedstawia taką kontrolę dla innej linii komórkowej (Ryc. 24b) co nie jest najwłaściwszym postępowaniem eksperymentalnym.

Podsumowując, w rozdziale *Wyniki* doktorantka przedstawiła szereg podejść eksperymentalnych mających na celu wytworzenie, czy to poprzez proces selekcji czy też racjonalne projektowanie, pochodnych przeciwciał zdolnych do zablokowania oddziaływania pomiędzy fibroblastycznym czynnikiem wzrostu 1 i jego receptorem. Zablokowanie takiego oddziaływania wydaje się być istotne w leczeniu nowotworów, charakteryzujących się podwyższonym poziomem FGF1. Niektóre nowotwory płuca są przykładem tego typu chorób. Z uznaniem należy zauważyć, że podejścia eksperymentalne, zaplanowane w doktoracie, wymagały zastosowania całego spektrum technik i metod. Są to: technika selekcji *phage display*, izolacja aktywnych białek, metody interferometrii biowarstwowej, metody NMR, testy ELISA, praca z hodowlami komórkowymi, metody spektroskopii fluorescencyjnej, techniki klonowania. Zastosowanie tych technik i metod pozwoliło doktorantce na wytworzenie odpowiednich pochodnych przeciwciał oraz wnikliwą analizę ich oddziaływania z ich antygenami, zarówno prowadzoną *in vitro* jak i *in vivo*. Należy jednoznacznie uznać, że zaplanowane cele eksperymentalne zostały przez mgr Chudzian osiągnięte. Niektóre uzyskane fragmenty przeciwciał posiadają znaczący potencjał hamujący zależną od FGF1 aktywację receptora FGF1.

Sama praca doktorska została napisana w jasny i precyzyjny sposób. Nie mam również zastrzeżeń do graficznego przedstawienia wyników na rycinach. Autorka nie ustrzegła się jednak w pracy od kilku błędnych, nieprecyzyjnych bądź żargonowych sformułowań. Kilo Dalton jest jednostką masy atomowej a nie atomową jednostką masy (str. 8). Definicja pojęcia „polimorfizm pojedynczych nukleotydów” (str. 35) nie jest właściwa.

Autorka w pracy używa pojęcia namnażanie plazmidów co nie jest właściwe. Plazmidy są obecne w komórkach bakteryjnych w stałej liczbie kopii, a namnażaniu podlegają niosące je bakterie co umożliwia izolację z uzyskanej masy bakteryjnej dużej ilości plazmidowego DNA. Autorka używa pojęcia primery zamiast startery DNA (str. 57). W tabeli 5.1 po kodonach stop może lepiej byłoby nie podawać sekwencji aminokwasowej wyselekcjonowanych klonów. Taka sekwencja nie powinna się w tych klonach pojawić gdyż ten region nie powinien podlegać translacji. Czy rzeczywiście stężenie białek użytych do opłaszczania płytek wynosiło 100 mg/ml (str. 54)? Te pewne uchybienia nie wpływają jednak w sposób znaczący na wysoką wartość merytoryczną pracy.

Reasumując, pracę doktorską mgr Julii Chudzian oceniam bardzo wysoko. Nie mam żadnych wątpliwości, że przedstawiona do oceny praca w pełni spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim w artykule 13 „Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” z dnia 14 marca 2003. W związku z tym zwracam się do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Julii Chudzian do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

