

Kraków, 2 września 2020 r.



RECENZJA

Rozprawy Doktorskiej mgr Julii Aleksandry Chudzian
pt. „Fragmety przeciwciał specyficzne wobec fibroblastycznego
czynnika wzrostu (FGF1) oraz jego receptora, FGFR1”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska - wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka Otlewskiego w Zakładzie Inżynierii Białka na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego - dotyczy bardzo ważnego działu współczesnej medycyny, jakim jest walka z chorobami nowotworowymi i proponuje rozwiązania, jakich może dostarczyć arsenał zaawansowanych technik biochemicznych i technik z zakresu biologii molekularnej wspartych głęboką znajomością biologii komórki. Autorka proponuje skupienie się na ukierunkowanej terapii przeciwnowotworowej, uwzględniając rolę, jaką w procesach nowotworzenia odgrywają fibroblastyczne czynniki wzrostu (FGF) i ich receptory (FGFR). W pracy otrzymano i badano ligandy białkowe wiążące FGF1, FGFR1 lub też osłabiające interakcje FGF-FGFR1.

W rozdziale Wstęp omówiono ogólnie zagadnienia dotyczące chorób nowotworowych (w tym dane epidemiologiczne oraz - oczywiście - cechy wyróżniające nowotwory, zilustrowane ryciną zaadaptowaną z pracy Hananah i Weinberg) i metod leczenia tych chorób, ze szczególnym uwzględnieniem terapii celowanych. Wśród tych terapii szczególne miejsce mają przeciwciała, co Autorka też znakomicie uwypukliła - również w aspekcie historycznym - opisując nie tylko różne rodzaje przeciwciał stosowanych w terapii chorób nowotworowych ale także różne ich rodzaje i różne sposoby ich otrzymywania. Ponadto, omówione zostały koniugaty przeciwciało-lek i na końcu - alternatywne formaty, takie jak rekombinowane fragmenty przeciwciał. Wstęp zamyka opis fibroblastycznych czynników wzrostu i ich receptorów: ich struktury, szlaków sygnałowych, roli w procesie nowotworzenia oraz potencjalnych terapii opartych na próbie

Wydział
Biochemii, Biofizyki
i Biotechnologii

Zakład Biochemii Fizycznej
Prof. dr hab. Marta
Dziedzicka-Wasylewska

ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków
tel. +48(12) 664 61 22
fax +48(12) 664 69 02
email: marta.dziedzicka-
wasylewska@uj.edu.pl

blokowania oddziaływania FGF-FGFR. Wstęp jest napisany bardzo klarownie, znakomicie podsumowując kluczowe informacje.

Cele Rozprawy zostały jasno sformułowane.

Rozdział Materiały zawiera wszelkie informacje o użytych odczynnikach, wektorach plazmidowych, enzymach restrykcyjnych, oligonukleotydach, licznych przeciwciałach, szczepach bakteryjnych, liniach komórkowych itp. Szczegółowo omówiono biblioteki fagowe. Ponadto, omówiono zastosowane złoża i kolumny chromatograficzne, odczynniki użyte do elektroforezy i techniki *Western blot* a także te właściwe dla interferometrii biowarstwowej i mikroskopii fluorescencyjnej. Wymieniono też wszystkie zastosowane aparaty oraz programy komputerowe i internetowe bazy danych.

Podobnie, w rozdziale Metody, bardzo klarownie opisano protokoły postępowania dla każdego rodzaju eksperymentu, m.in. - przygotowanie białek fuzyjnych (ECD_FGFR1-Fc) potrzebnych do selekcji fagów prezentujących fragmenty przeciwciał scFv z bibliotek Tomlinson I i J czyli: przygotowanie konstruktów, namnożenie w komórkach bakteryjnych, nadprodukcja białka w komórkach CHO-S, oczyszczanie białka, weryfikacja technikami *Western blot* i spektrometrii mas; następnie sama selekcja pożądanego fragmentu przeciwciała metodą *phage display* i testy oceny poprawności i efektywności procesu selekcji (ELISA, interferometria biowarstwowa, sekwencjonowanie DNA). Dalej - przystąpiono do nadprodukcji i oczyszczania fragmentów białek scFv i ich charakterystyki poprzez analizę parametrów wiązania do antygeny, włącznie z weryfikacją miejsca wiązania do FGF1 (mapowanie epitopów) i wyznaczeniem parametrów kinetycznych metodą interferometrii biowarstwowej - to wszystko świadczy o rozlegle zakrojonych badaniach i fantastycznym warsztacie. Podjęto także współpracę z prof. Holakiem z Wydziału Chemii UJ w Krakowie, aby metodą NMR dodatkowo zanalizować wiązanie wybranych fragmentów scFv do FGF1.

W dalszej części klony scFv o najlepszym powinowactwie do FGF1 przygotowano w formie scFv-Fc i analizowano kinetykę wiązania. W dwóch modelach komórkowych, tj. mysich fibroblastach NIH/3T3 (linia wykazująca naturalną ekspresję FGFR1) oraz w komórkach ludzkiego kostnomięsaka, stabilnie transfekowanych genem kodującym FGFR1 ((U2OSR1) badano szlaki sygnałowe zależne od FGFR1. Do testów proliferacyjnych zastosowano jeszcze jedną linię komórkową o naturalnie podwyższonej ekspresji FGFR1, G-292.

W końcowej części pracy przystąpiono do badania cząsteczek typu *peptibodies* złożonych z peptydów rozpoznających receptor dla FGF1 (FGFR1) w fuzji z fragmentem Fc – w tym etapie również zaprojektowano plazmidy zawierające żądane sekwencje (wybrane na podstawie analizy sekwencji czynnika FGF2, zdolnych do wiązania FGFR1 – dwie sekwencje oddzielnie, 48-58 i 59-68, oraz jedną powstałą z ich połączenia, 48-68), przystąpiono do ich nadprodukcji, oczyszczania i oceniono ich specyficzność, internalizację oraz wpływ na oddziaływanie ligand-receptor – badania te prowadzono na liniach komórkowych użytych w poprzednich etapach pracy.

Z rozdziału tego bije porządek – sędzę, że naprawdę niełatwo było zebrać całą tę złożoną metodykę w taki zwięzły a zarazem informatywny sposób. Czyta się to dobrze, łatwo wrócić do opisów poszczególnych doświadczeń, chociaż jest ich ogromnie dużo.

Podobnie, rozdział Wyniki jest bardzo dobrze przedstawiony – wszystkie eksperymenty są świetnie opisane, znakomicie wyjaśniony został cel każdego z nich, stosowane kontrole a potem omówiony uzyskany wynik; niekiedy od razu skomentowany, szczególnie gdy nie był on akurat oczywisty.

Technika *phage display* pozwoliła wytypować 368 klonów scFv, test przesiewowy techniką ELISA zawęził tę liczbę do 51 klonów wykazujących wiązanie do FGF1; z kolei test przesiewowy metodą interferometrii biowarstwowej pozwolił wytypować 30 klonów, które

następnie poddano sekwencjonowaniu w celu poznania reszt aa obecnych na kluczowych pozycjach w regionach determinujących komplementarność i do dalszej analizy wybrano 7 przeciwciał formatu scFv o najlepszych właściwościach wiązania antygeny i zawierających unikatowe motywy aminokwasowe w regionach hiperzmiennych - te warianty wyprodukowano w systemie ekspresyjnym i były one przedmiotem następnych analiz. Badania kinetyki oddziaływania tych wariantów scFv z FGF1 z zastosowaniem techniki BLI doprowadziły do wyselekcjonowania 4 fragmentów scFv o najkorzystniejszych parametrach wiązania, które jednak zdecydowano się jeszcze poprawić poprzez fuzję tych fragmentów z fragmentem CH2-CH3 ludzkiej immunoglobuliny G₁. Te warianty oraz ich pochodne w formacie scFv-Fc (3 z nich - wybrane na podstawie analizy stałych wiązania) były przedmiotem dalszych badań ich aktywności biologicznej, podobnie jak 3 formy *peptibodies*. Wszystko jest przedstawione starannie i przejrzystie - tak jak i starannie zaplanowane były wszystkie eksperymenty.

Mimo ogólnie entuzjastycznej oceny całego wysiłku włożonego w realizację tej pracy mam kilka uwag:

Autorka bardzo dokładnie opisuje parametry przeprowadzonych eksperymentów w rozdziale Metody, ale moim zdaniem w podpisach pod rycinami, szczególnie tymi, które ilustrują wyniki badań efektywności biologicznej badanych preparatów, powinny się znaleźć niektóre dane o eksperymentach - przede wszystkim stężenia stosowanych preparatów białkowych. I tu nasuwa się też pytanie, dlaczego te stężenia są różne? Gdy opisane jest „Badanie aktywacji wewnątrzkomórkowych ścieżek przekazywania sygnału” (4.10, str. 60) białka scFv i scFv-Fc dodawane są w stężeniu 15 µg/ml a białko FGF1 - 2 ng/ml, natomiast gdy badana jest aktywność biologiczna w testach proliferacyjnych (4.11, str. 60) - scFv i scFv-Fc są w stężeniu 100 µg/ml a FGF1 - w stężeniu 5 ng/ml. Z kolei w przypadku *peptibodies* (4.13.1, str. 61) w badaniach wpływu na aktywność FGFR1 zastosowano

stężenie 40 $\mu\text{g/ml}$ a gdy badano wiązanie do FGFR1 (4.13.2, str. 62) stężenie to wynosiło 10 $\mu\text{g/ml}$, zaś gdy badano kolokalizację z FGFR1 (4.13.2, str. 62) – to stężenie *peptibodies* wynosiło 4 $\mu\text{g/ml}$...

Optymalnie byłoby wykonać analogiczne eksperymenty z kilkoma stężeniami i wykreślić krzywą zależności efektu od stężenia; być może zresztą takie eksperymenty przeprowadzono i na ich podstawie wybrano te stężenia, które przedstawiono w Rozprawie, ale nie znalazłam o tym wzmianki... Z drugiej strony, mam pełną świadomość ogromu pracy, jaki był potrzebny do wygenerowania tych wyników i wiem, że „nie można zrobić wszystkiego”, ale pozwalam sobie na tę uwagę, bo tematyka jest zbyt ważna i ważka, i żeby te wszystkie rezultaty miały istotny „potencjał kliniczny” to i tak trzeba to będzie zrobić... Podobnie jak badania *in vivo*... 😊

Brakuje mi też analizy densytometrycznej wyników *Western blot* (rys. 21 i 24). Jak Autorka tłumaczy inne obrazy wykrywane przez te same przeciwciała w komórkach NIH/3T3 i komórkach U2OSR1? Wyniki zaprezentowane nie są jasno opisane. Czy na rys. 21b – rzeczywiście widać „brak wpływu fragmentu Fc na aktywację FGFR1...”? Czy na rys. 21c rzeczywiście scFvD2 „posiada zdolność do efektywnego blokowania aktywacji FGFR1 (...) czego dowodzi (...) obniżony stopień wykrywanej fosforylacji...”?

Brakuje mi też analizy statystycznej otrzymanych wyników – w zasadzie tylko w rozdziale 4.11 („Badanie aktywności biologicznej – testy proliferacyjne”) napisano, że „... Każde białko testowano w trzech powtórzeniach na płytce. Dla każdego preparatu wykonano trzy niezależne eksperymenty”. Pewnie w każdym innym przypadku było tak samo, ale powinno to być napisane. Nie przekonuje mnie opis wyników zaprezentowanych na Rys. 22 a: „...otrzymane wyniki wskazują, że (...) fragmenty przeciwciał scFvD2, scFvC1 i scFvE5 oraz wszystkie scFv-Fc wydajnie blokują mitogenną aktywność FGF1...” – czy na rysunku zaznaczono odchylenie czy błąd standardowy? Czy

efekt „E5” albo efekt „C1-Fc” (też na komórkach linii G-292, rys. 22b) jest rzeczywiście statystycznie znamieny w porównaniu z efektem samego FGF1? To powinno być policzone.

Podobnie, brak analizy statystycznej dotyczy wyznaczania wartości stałych kinetycznych – czy oznaczenia były powtarzane? To ważny eksperyment, gdyż na podstawie tych wyników dokonano ostatecznej selekcji fragmentów przeciwciał scFv.

Ciekawy jest brak wpływu przeciwciał scFv w formie Fc na aktywację receptora FGFR1 w komórkach, podczas gdy mają one działanie w drugim teście komórkowym. Autorka odnosi się do tego wyniku wskazując możliwość tworzenia przez fragment Fc „zawady sterycznej”, natomiast fragment Fc dołączony do badanych *peptibodies* nie przeszkadza w działaniu tych „preparatów fuzyjnych” na poziomie FGFR1.

Czy internalizacja *peptibodies* następuje razem z receptorem dla FGF1? Trudno się zorientować z rycin dostępnych w pracy... Dla porządku warto by też sprawdzić, czy w komórkach pozbawionych FGFR1 taka internalizacja by miała miejsce? I co ta internalizacja znaczy dla komórki? Czy możliwa jest aktywacja jakichś procesów prowadzących do śmierci komórki?

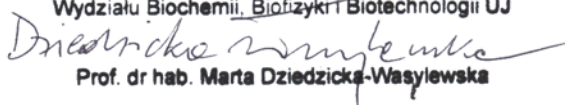
Wszystkie uzyskane wyniki zostały przedyskutowane w krótkim acz treściwym rozdziale Dyskusja; osadzono je w szerszym kontekście literaturowym. Rozprawę kończy rozdział Podsumowanie i obszerna Bibliografia (295 pozycji), spis Rysunków i Tabel oraz wykaz pozycji z dorobku naukowego Doktorantki.

Praca jest bardzo starannie przygotowana pod względem edytorskim, jest ładnie napisana, czyta się ją swobodnie, mimo iż zarówno techniki badawcze jak i badane zagadnienia są skomplikowane. Nie jest łatwo w tak komunikatywny sposób przedstawić wielość zastosowanych narzędzi badawczych, m.in. zaawansowanych technik z zakresu biologii molekularnej, biochemii

strukturalnej i biologii komórki, uzyskanych tymi technikami wyników i ich interpretacji w szerokim kontekście ukierunkowanej terapii przeciwnowotworowej – wszystko to jest w pracy bardzo przejrzyste, uporządkowane i w sposób bardzo estetyczny przedstawione.

Zważywszy na bardzo zaawansowany warsztat naukowy oraz na swobodę, z jaką Doktorantka posługuje się bardzo nowoczesnymi technikami badawczymi a także doceniając wielki wysiłek, który podjęła uzyskując ogrom wartościowych wyników będących nowością naukową stwierdzam, że przedstawiona do recenzji Rozprawa Doktorska spełnia warunki określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 r. z późniejszymi zmianami.

Stawiam więc wniosek o dopuszczenie Pani mgr Julii Aleksandry Chudzian do dalszych etapów przewodu doktorskiego i proponuję wyróżnienie tej Rozprawy stosowną nagrodą.

KIEROWNIK
Zakładu Biochemii Fizycznej
Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ

Prof. dr hab. Marta Dziędzicka-Wasylewska