



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFOZYKI I BIOTECHNOLOGII
ZAKŁAD MIKROBIOLOGII
KIEROWNIK
PROF. DR HAB. JAN POTEPA

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Świdorskiej

pt. „Konjugat zasadowego fibroblastycznego czynnika wzrostu (FGF2) zawierający dwa związki cytotoksyczne o różnym mechanizmie działania”

W ostatnich latach dokonał się ogromny postęp w leczeniu nowotworów. Zawdzięczamy go wprowadzeniu do klinik onkologicznych leków określanymi mianem preparatów biologicznych. Są nimi przeciwciała monoklonalne lub białkowe ligandy rozpoznające swoiste struktury antygenowe lub receptory na powierzchni komórek rakowych, które są nieobecne lub występują w niewielkich ilościach na zdrowych komórkach. Te specyficzne ligandy i przeciwciała koniuguje się z białkowymi toksynami zabijającymi komórki lub cytotoksycznymi związkami. Ta nowa generacja preparatów biologicznych wykorzystywana jest w przeciwnowotworowej terapii celowanej, która w przeciwieństwie do chemoterapii i radioterapii wybiórczo niszczy komórki nowotworowe wywołując niewielkie skutki uboczne. Pomimo licznych sukcesów terapii celowanej, która uczyniła możliwym skuteczne leczenie wielu nowotworów, to nadal wiele z raków opiera się najbardziej wyrafinowanym metodom leczenia. Spowodowane jest to heterogennością komórek nowotworowych i związaną z nią lekoopornością, w tym również na leczenie celowane. Z tego względu niezbędne jest poszukiwanie nowych sposobów swoistego dostarczania cytotoksycznych związków do komórek nowotworowych. W ten bardzo istotny i wysoce konkurencyjny nurt badań w sposób genialny wpisuje się praca doktorska mgr Karoliny Świdorskiej wykonana w Zakładzie Inżynierii Białka na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka Otlewskiego.

W swojej pracy doktorskiej mgr Świdorska wykorzystowała białkowy czynnik wzrostu fibroblastów-2 (FGF2) sprzężony z dwoma związkami cytotoksycznymi o odmiennym mechanizmie działania aby wprowadzić je równocześnie do komórek nowotworowych. Mechanizm celowego działania tak przygotowanego preparatu biologicznego polega na tym, że wiele nowotworów złośliwych cechuje się nadekspresją receptora swoście wiążącego FGF2

(FGFR1). Wiązanie liganda (FGF2) z FGFR1 prowadzi do jego internalizacji i wybiórczego zabijania komórek nowotworowych przez dostarczone do komórek związki cytotoksyczne. Aby osiągnąć ten cel doktorantka opracowała metodę nadprodukcji białka FGF2 zawierającego nienaturalną resztę aminokwasową – propargylolizynę – wprowadzoną za pomocą kodonu amber w miejsce jednej z dwóch reszt cysteiny w powierzchniowych pętlach łańcucha polipeptydowego FGF2. Dzięki temu było możliwe przyłączenie pochodnej monometyloaurystatyny E poprzez reakcję cykloaddycji azydków do terminalnych alkinów łańcucha bocznego propargylolizyny. Pozostała reszta cysteiny została wykorzystana do przyłączenia pochodnej alfa-amanityny w reakcji grupa tiolowa-maleimid.

Nienaruszona struktura i aktywność biologiczna (wiązanie się z FGFR1, aktywacja kaskad sygnałowych i internalizacja) jednorodnego produktu zawierającego dwa związki cytotoksyczne została zweryfikowana doświadczalnie stosując odpowiednie do tego metody. Na 3-cim etapie badań potencjał zabijania komórek nowotworowych cząsteczki FGF2 z przyłączonymi związkami cytotoksycznymi (pojedyncze i podwójny koniugat) został przetestowany na linii komórek nowotworów płuc i ludzkiego kostniakomięsaka. W tych doświadczeniach doktorantka wykazała znacznie wyższy synergistyczny efekt cytotoksyczny podwójnie sprzężonego FGF2 niż pojedynczych koniugatów, który zależał od poziomu ekspresji FGFR1. W ten sposób osiągnięty został cel pracy doktorskiej jakim było opracowanie metody produkcji FGF2 z przyłączonymi związkami cytotoksycznymi, który może być wykorzystany w terapii celowanej do niszczenia lekoopornych komórek nowotworowych z nadprodukcją FGFR1.

Ten krótki opis osiągnięć mgr Świdarskiej w żaden sposób nie oddaje wkładu pracy, inwencji, szerokiej wiedzy teoretycznej i praktycznej w zakresie chemii i biologii, które były niezbędne do realizacji projektu. Czytając rozprawę nie jest trudno się zorientować, że sukces nie przyszedł doktorantce łatwo i wymagał zastosowania wielu różnorodnych innowacyjnych metod. Ten aspekt pracy należy docenić w szczególny sposób. W związku z stosowanymi metodami mam jednak szereg pytań, na które oczekuję odpowiedzi w czasie publicznej obrony:

- 1) Do pomiaru zdolności wiązania koniugatów FGF2 z receptorem (FGFR1) wykorzystano metodę interferometrii biowarstwowej (ang. *bio-layer interferometry*). Proszę o zwięzłe przedstawienie na czym ta metoda polega, najlepiej w czasie autoreferatu.
- 2) Poziom ekspresji FGFR1 był szacowany na podstawie wyniku analizy Western Blot. Zastanawiam się, dlaczego nie skorzystano z cytometrii przepływowej, która jest metodą ilościową, a w dodatku pozwalającą mierzyć wyłącznie receptor na powierzchni komórek?

3) Analiza widma emisji fluorescencji była rutynowo stosowana do weryfikacji natywnej struktury renaturowanych koniugatów białka EGF2. Jednorazowo (rysunek 34) zastosowano do tego celu pomiar dichroizmu kołowego (CD). Czy był jakiś powód, dla którego za każdym razem nie stosowano CD do weryfikacji struktury renaturowanych białek? Przy okazji chciałbym się dowiedzieć jakie jeszcze inne metody mogą służyć do potwierdzenia prawidłowej struktury rekombinowanych białek?

Uwagi krytyczne:

Za wyjątkiem braku statystycznej analizy wyników cytotoksycznego działania podwójnych i pojedynczych koniugatów EGE2 na różne typy komórek (rysunki 40-42) praktycznie nie mam żadnych uwag krytycznych. Uwagi te ograniczają się one do wypunktowanie „literówek”, stosowania żargonu laboratoryjnego w tekście pracy oraz niewielkich nieścisłości technicznych. Dla porządku i niejako z konieczności udowodnienia, że z uwaga przeczytałem całą pracę doktorską wymieniam te potknięcia w kolejności, w jakiej pojawiły się w tekście pracy.

str. 35, 3 linia od góry: jest „dobywać” – powinno być „odbywać”

str. 37, 4 linia od dołu: jest „lnnym” – powinno być „lnny”

str. 38, 4 linia od dołu: w języku polskim chyba nie ma słowa „cytotoksyk”

str. 52, 4 linia od dołu: jest „emperaturze” – powinno być „temperaturze”

str. 53, jest „preparacja” – powinno być „przygotowanie”. „Preparacja” pojawia się jeszcze na stronie 62.

str. 53, linia 7 od góry: 2 x „C”

str. 60, linia 2 od dołu: jest „kuweta kwarcowa o grubości 10 mm” – powinno być „kuweta kwarcowa o drodze optycznej 10 mm”

str. 61, linia 5 od góry: j.w.

str. 64/65/66: Fluorescencję rezorufiny mierzono przy długości fali 590 nm. Jaka była długość fali wzbudzającej?

Biorąc pod uwagę, że rozprawa liczy 114 stron, a znalazłem w niej tylko 10 nieścisłości, więc można powiedzieć, że praca jest napisana praktycznie bezbłędnie.

Uwagi redakcyjne:

Pod względem objętości pracy, podziału na rozdziały oraz od strony redakcyjnej tekstu i ilustracji rozprawa mgr Karoliny Świdorskiej mieści się w normach ogólnie przyjętych dla tego typu opracowań. Liczy 114 strony tekstu, zawiera 44 rysunki i schematy oraz 16 tabeli.

Wstęp (Rozdział 1) liczy 27 stron maszynopisu jest doskonałym wprowadzeniem do zagadnień, takich jak metody stosowane w antynowotworowej terapii celowanej z zastosowaniem koniugatów związków cytotoksycznych z monoklonalnymi przeciwciałami oraz z FGF2. Opisane są również obecne stosowane w terapii nowotworów celowane leki biologiczne, przedstawiony jest ich mechanizm działania, jak również metody konstruowania homogennych koniugatów białko-związek cytotoksyczny. Rozdział ten jest zredagowany w inteligentny i klarowny sposób i zawiera wszystkie niezbędne informacje nawiązujące do wyników opisanych w rozprawie. We wstępie brakuje mi tylko krótkiego opisu innych terapii celowanych, z wykorzystaniem związków radioaktywnych, fotodynamicznych czy toksyn bakteryjnych. Proponuję, żeby w czasie obrony doktorantka krótko zreferowała te nowoczesne metody leczenia nowotworów w kontekście ich przewag i wad w porównaniu z metodą bazująca na FGF.

Cele pracy sformułowane są precyzyjnie na jednej stronie maszynopisu (Rozdział 2).

Materiały stosowane w pracy (Rozdział 3) oraz metody (Rozdział 4) są szczegółowo i bardzo jasno opisane. Ta część rozprawy liczy 24 strony maszynopisu.

Wyniki (Rozdział 5) przedstawione są na 33 stronach w sposób bardzo przejrzysty. Zrozumienie wyników ułatwiają doskonale przygotowane ryciny i tabele.

Licząca 9 stron dyskusja (Rozdział 6) jest napisana po mistrzowsku i podobnie jak pozostałe części pracy czyta się ją z prawdziwą przyjemnością.

Ogólne podsumowanie (Rozdział 7) mieści się na jednej stronie i wypunktowuje nowatorskość zastosowanej metody i główne osiągnięcia opisane w pracy.

Pracę kończy wykaz literatury, obejmujący 136 pozycji bardzo dobrze wybranych z pośród wielu tysięcy prac, które ukazały się w tym temacie. Dowodzi to o dojrzałym, znakomitym przygotowaniu doktorantki do podjęcia postawionych sobie celów badawczych. W przeważającej większości są to artykuły oryginalne opublikowane w okresie ostatniej dekady.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska mgr Karoliny Świderskiej zawiera oryginalne wyniki badań, cechujące się dużą nowością naukową. Wnoszą one nowatorski wkład w planowanie antynowotworowych terapii celowanych opartych o podwójne koniugaty czynników synergistycznie działających czynników cytotoksycznych sprzęgniętych z FGF2. Część z przedstawionych w rozprawie wyników została opublikowana w *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, co bezstronnie świadczy o ich wartości naukowej. Doktorantka jest pierwszym autorem tej pracy, nie ma więc wątpliwości jaki był jej udział w przeprowadzonych badaniach. Z tego względu biorąc pod uwagę nowatorstwo i znaczenie poznawcze, jak również potencjalne aplikacyjne zastosowanie opisanych w rozprawie związków antynowotworowych oraz dorobek naukowy doktorantki stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Karoliny Świderskiej spełnia wszystkie zwyczajowe i ustawowe wymagania stawiane tego typu pracom w dziedzinie chemii/biochemii i zasługuje na wyróżnienie odpowiednią nagrodą. Wnoszę więc do wysokiej Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie jej autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink that reads "Jan Potempa". The signature is written in a cursive, flowing style.