



Zofia Szwejkowska-Kulińska, prof. dr hab.  
Zakład Ekspresji Genów

Poznań, 18.08.2016

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Aleksandry Sokołowskiej-Wędziny zatytułowanej  
„Selekcja fragmentów przeciwciał wobec receptora 1 czynnika wzrostu fibroblastów  
w celu zastosowania w terapii przeciwnowotworowej”**

Praca doktorska mgr Aleksandry Sokołowskiej-Wędziny została wykonana w Zakładzie Inżynierii Białka Wydziału Biotechnologicznego Uniwersytetu Wrocławskiego pod opieką promotora prof. dr hab. Jacka Otlewskiego. Zakład prof. dr hab. Jacka Otlewskiego prowadzi między innymi szeroko zakrojone prace nad charakterystyką strukturalną i funkcjonalną białek związanych z sygnalizacją komórkową, selekcją i badaniem białek o potencjale medycznym, ze szczególnym uwzględnieniem opracowywania terapii antynowotworowych. Praca mgr Aleksandry Sokołowskiej-Wędziny wpisuje się całkowicie w nurt badań prowadzonych w Zakładzie Inżynierii Białka.

Najbardziej ogólnym celem pracy doktorskiej było stworzenie nowego, potencjalnego leku antynowotworowego skutecznie i w sposób celowany zabijającego komórki raka płuca. W przypadku rozwinięcia się drobnonabłonkowego raka płuca u około 20% pacjentów, a w przypadku niedrobnokomórkowego raka płuca u około 6% pacjentów, dochodzi do amplifikacji genu *FGFR1* (Fibroblast Growth Factor Receptor 1) w obszarze guza. Co ważne, amplifikacja genu *FGFR1* koreluje z paleniem tytoniu i występuje również w innych typach nowotworów, na które cierpią osoby palące. Jedną z metod leczenia chorób nowotworowych związanych z jednogennymi amplifikacjami receptorów powierzchniowych komórek nowotworu jest technika ADC (stosowanie leku opartego o koniugat przeciwciała – związek cytotoksyczny). W swojej pracy Doktorantka postanowiła uzyskać drogą selekcji rekombinowany fragment przeciwciała (scFv) specyficzny wobec zewnątrzkomórkowej domeny *FGFR1*, dokonać zmiany jego formatu do scFv diabody i scFvFc, przeprowadzić analizy oddziaływania z receptorem, wydajności i prawidłowej internalizacji fragmentów przeciwciał w modelach komórkowych, sprzęgnięcia najlepszego fragmentu przeciwciała z silnie toksycznym związkiem MMAE, a następnie charakterystykę koniugatu pod względem internalizacji komórkowej i ocenie jego cytotoksyczności w wybranych modelach komórkowych i wreszcie ocenie cytotoksyczności preparatu na immunokompetentnym szczepie myszy BALB/c. Można powiedzieć, że cel pracy został nakreślony bardzo szeroko, a jego realizacja wymagała bardzo dużego wkładu pracy i zastosowania różnorodnych technik badawczych. Doktorantka wszystkie te cele zrealizowała.

Na początek Doktorantka uzyskała białka fuzyjne ludzkiej zewnątrzkomórkowej domeny *FGFR1* z fragmentem Fc ludzkiej immunoglobuliny G1. Domena ta zbudowana jest z trzech subdomen, przy czym pre-mRNA *FGFR1* obejmujący subdomenę D3 podlega alternatywnemu splicingowi, co prowadzi do powstania dwóch izoform *FGFR1* – IIIb i IIIc. Izoformy te, jak podaje Doktorantka, różnią się specyficznością wiązania czynników wzrostowych (jest 18 różnych FGF). Nie do końca jest dla mnie jasne, którą z izoform





i czemu uzyskiwała Kandydatka w formie fuzyjnego białka. Bardzo prosiłabym o wyjaśnienie w trakcie obrony pracy doktorskiej. Ponadto Doktorantka przygotowała konstrukty do nadekspresji pozostałych receptorów FGFR (FGFR2, FGFR3 i FGFR4) i samej domeny Fc. Białka rekombinowane uzyskano w komórkach ssaczy CHO-S, zapewniających pełną glikozylację powstających białek. Uzyskano nadprodukcję wszystkich białek, potwierdzono ich glikozylację. Do tej części pracy mam następujące pytania i uwagi: Rys. 30 – poszczególne panele rysunku nie są mianowane i bardzo trudno było mi wydedukować co jest panelem „d”, „e” i „f”. Bardzo proszę o wyjaśnienia. Czy mogłaby prosić o wytłumaczenie dlaczego SDS PAGE zawyża masę cząsteczkową glikozylowanych białek w porównaniu z metodą spektrometrii mas? Czy produkowane w wybranym systemie komórkowym Fc może ulec glikozylacji? Czemu biotynylacji białka ECD\_FGFR1a-Fc-Avi towarzyszy ponowne rozmycie prążka elektroforetycznego?

Uzyskane fuzyjne białka posłużyły do selekcji ludzkich scFv specyficznych wobec FGFR1. Ludzkie przeciwciała w formacie scFv wyselekcjonowano z rekombinowanych bibliotek ludzkich scFv Tomlinson I i Tomlinson J dostępnych komercyjnie i stosując technikę prezentacji fagowej (phage display). Każda runda selekcji (a było ich trzy) była poprzedzona „wymiarowaniem” bibliotek scFv w kierunku usunięcia przeciwciał rozpoznających tylko fragment Fc. Z uzyskanych kolonii losowo wybrano ponad 350 i sprawdzono testem ELISA pod kątem wiązania do białka ECD\_FGFR1a-Fc. Z tej puli wytypowano 48 najlepszych klonów do analizy SPR (powierzchniowy rezonans plazmonowy) by wytypować te ludzkie scFv, które miały najkorzystniejszą kinetykę wiązania rekombinowanych fragmentów przeciwciał do FGFR1. Wyłoniono 28 klonów, z których ostatecznie do dalszej charakterystyki wybrano siedem o najlepszych właściwościach wiązania do antygeny i po sekwencjonowaniu okazało się, że mają unikatowe motywy aminokwasowe w regionach CDR2 i CDR3 regionów zmiennych łańcucha lekkiego i ciężkiego. Siedem wyselekcjonowanych białek poddano indywidualnej nadprodukcji w komórkach *E.coli* HB2151 do szczegółowych pomiarów kinetyki wiązania FGFR1 i sprawdzenia reaktywności krzyżowej wobec FGFR2, FGFR3, FGFR4 i Fc. Dwa wyselekcjonowane scFv (scFvD2 i scFvC1) wykazały najmniejszą reaktywność krzyżową i bardzo dobre parametry kinetyki wiązania FGFR1. Te dwa białka (scFvD2 i scFvC1) wytypowano do analizy dodatkowego wiązania FGF2 i krzyżowego (scFvD2 versus scFvC1) przez FGFR1. Stosując nadal technikę SPR wykazano, że białka scFvD2, scFvC1 i FGF2 oddziałują z różnymi, nienakładającymi się domenami z ECD\_FGFR1-Fc. Nie jestem specjalistą techniki SPR i w błąd wprowadzały mnie sensogramy przedstawione na rysunkach 35, 38, 39 ukazujące, jak wydaje mi się, kolejne „nastrzykiwania” prób, stąd całkowity czas przebiegu reakcji wynosił od 3000 s do 7700s. Tymczasem czasy pomiaru kinetyki wiązania dla indywidualnych wariantów scFv pokazują, że mieściły się one w zakresie od 0 do 290 s. Przy sensogramach ukazujących więcej niż jeden pomiar ta sama cząsteczka białka (np. D2 z rys.38) ma inny czas wiązania do FGFR1 niż na rys. 37. Wprowadza to niepotrzebny zamęt i należałoby się zastanowić jak zobrazować w inny sposób seryjne nastrzykiwania kolejnych preparatów i pomiary kinetyki. W dalszej części doktoratu podjęto ciekawą próbę ulepszenia wariantu scFvD2 wprowadzając losowe zmiany do pętli CDR1 łańcucha lekkiego i ciężkiego tego przeciwciała. Niestety nie





udało się poprawić parametrów kinetycznych wiązania z FGFR1, które skąd inąd i tak były bardzo dobre. Natomiast postanowiono ulepszyć tą samą metodą inny wyselekcjonowany fragment scFv – scFvE2. W tym wypadku uzyskano warianty charakteryzujące się lepszymi parametrami kinetycznymi, a najlepszy z nich nazwano scFvE2A8. Dla trzech ostatecznie wyselekcjonowanych fragmentów scFv: scFvC1, scFvD2 i scFvE2A8 dokonano przeformowania do scFv diabody i scFvFc. Uzyskanie scFv diabody było wykonane drogą skrócenia łącznika występującego pomiędzy wewnętrznymi domenami scFv co doprowadzało do spontanicznej dimeryzacji scFv do scFv diabody. Z kolei warianty scFvFc uzyskano poprzez fuzję scFv do fragmentu CH2-CH3 ludzkiej immunoglobuliny G1 (fragment Fc). Zadziwił mnie ponad 10-krotny wzrost wydajności izolacji białek scFvFc. Czy to jest efekt stabilizacji białek przez Fc?

W kolejnym etapie pracy Doktorantka przystąpiła do charakterystyki biwalentnych formatów wybranych scFv. Oba formaty scFv znacząco zwiększyły powinowactwa do antygeny (receptora FGFR1) jednak najlepsze parametry uzyskano dla biwalentnych formatów FcFvD2. Te właśnie przeciwciała (scFvD2, scFvD2 diabody i ScFvFc) poddano analizie funkcjonalnej w modelach komórkowych U20S-R1 (nadprodukcja FGFR1) i U20S (naturalnie niska ekspresja FGFR1), a także w liniach komórek raka płuc drobnokomórkowego (DMS114) i niedrobnokomórkowego (NCI-H1581).

Trochę mnie zdziwił wynik western dla FGFR1 w czterech badanych liniach komórkowych. Oczywiście, widoczny jest wysoki bądź niski poziom FGFR1 ale występują trzy formy tego białka i nie zostały opisane. Czy są to izoformy splicingowe? A może któreś z nich to fosforylowane/defosforylowane białka? W dalszych częściach doktoratu widać, że Autorka dysponuje przeciwciałami specyficznymi na ufosforylowaną formę FGFR1. Czy wiadomo, czy i która z trzech form na rys. 45 odpowiada formie ufosforylowanej? Stosunek poszczególnych form FGFR1 w liniach komórkowych jest różny (np. preferencyjna obecność formy środkowej w linii DMS114, słaba reprezentacja najszybciej migrującej izoformy w linii NCI-H1581, linia U20S-R1 jest pod tym względem nieczytelna). Być może jest to ciekawy klucz do regulacji pewnych form FGFR1 w różnych formach raka płuc z nadekspresją FGFR1? Ważne są jednak dalsze wyniki uzyskane przez Doktorantkę, które pokazują, że żadne z przeciwciał z serii D2 nie aktywuje (fosforyluje) FGFR1, podczas gdy naturalny ligand FGF2 wydajnie aktywował swój receptor FGFR1. Bardzo byłabym ciekawa czy gdyby wykonać doświadczenie, w którym dodano by równocześnie FGF2 i scFvD2Fc (a wiążą inne subdomeny FGFR1) to czy FGF2 stymulowałoby ścieżkę transdukcji sygnału poprzez fosforylację FGFR1? Gdyby okazało się, że następuje blokada aktywacji FGFR1 przeciwciałem, pomimo związania FGF2, to byłby to kapitalny wynik! A w chorym organizmie człowieka FGF2 będzie współwystępował z podawanym jako lek przeciwciałem! Bardzo proszę o komentarz w trakcie obrony pracy doktorskiej.

W serii eleganckich doświadczeń przebadano wydajność internalizacji i prześledzono lokalizację wewnątrzkomórkową przeciwciał z serii D2 w komórkach U20S-R1 i U20S. Najwyższy poziom internalizacji osiągnięto dla scFvD2Fc. W komórkach U20S nie zauważono procesu internalizacji scFvD2Fc wcale. Zasadniczo chętnie usłyszałabym zdanie Doktorantki na temat różnic w internalizacji serii przeciwciał D2 w zależności od formatu





cząsteczki. Przy okazji tych doświadczeń chciałabym zaznaczyć, że rysunek 47 składa się z niemianowanych części a i b, a część b nie została opisana w legendzie rysunku. Chciałabym się jeszcze odnieść do wartości współczynnika korelacji Pearsona, który osiąga wartości od 0 do 1. Szkoda, że Autorka nie zamieściła zdjęcia z internalizacji i kolokalizacji FGF2 wyznakowanego barwnikiem DL (dyLight550) z markerami wczesnych endosomów i lizosomów. Wartość kolokalizacji z wczesnymi endosomami jest niska – 0.37 i wskazuje na bardzo słabą kolokalizację FGF2 z wczesnymi endosomami. Czy są jakieś powody tej różnicy w stosunku do ładnych wyników uzyskanych dla scFvD2Fc-DL? W kolejnym etapie scharakteryzowano internalizację i lokalizację scFvD2Fc w komórkach raka płuca, które nadprodukowały FGFR1. Zaobserwowano wydajną internalizację scFvD2Fc w obu typach badanych komórek raka płuc, choć wymagany czas dla jednego z typu komórek (DMS114) był znacznie dłuższy. Może ma to związek z różnym stosunkiem izoform FGFR1 w obu badanych liniach komórkowych?

Uzyskanie wydajnego wprowadzania scFvD2Fc do komórek rakowych pozwoliło na przeprowadzenie kolejnego etapu badań – czyli przygotowania i charakterystyki koniugatu scFvD2Fc-vcMMAE, czyli sprzężenia przeciwciała z inhibitorem polimeryzacji tubulin, toksyny hamującej podziały komórkowe. Taką cząsteczkę otrzymano, zbadano liczbę przyłączonych cząsteczek MMAE do przeciwciała, którą ustalono na 4, a także wykazano, że reakcja koniugacji vcMMAE do scFvD2Fc zachodzi z bardzo wysoką wydajnością. Analiza gotowej cząsteczki pod kątem internalizacji w komórkach U20S-R1 wskazała na efektywne i szybkie wchłanianie produktu do komórek na drodze endocytozy zależnej od FGFR1. Bardzo interesowałaby mnie informacja na temat jak wydajnie vcMMAE w komórce uwalnia się z koniugatu? Gdzie następnie można ten związek zlokalizować?

W kolejnych doświadczeniach oceniono cytotoksyczność MMAE w komórkach badanych linii komórkowych i wykazano, że wszystkie linie były wrażliwe na sam ten związek. Taki sam eksperyment wykonano dla scFvD2Fc-vcMMAE. Uzyskano bardzo dobre i ciekawe wyniki pokazujące, że związek ten ma silne i specyficzne działanie cytotoksyczne na komórki U20S-R1 z nadprodukcją FGFR1, a nie ma takiego efektu na komórki U20S, a ponadto związek ten był wysoce cytotoksyczny dla badanych komórek linii raka płuc.

Doktorat wieńczy doświadczenie, w którym określono maksymalną tolerowaną dawkę dla scFvD2Fc-vcMMAE *in vivo* badając przeżywalność immunokompetentnych myszy. Ustalono taką dawkę w mg/kg masy ciała w doświadczeniach, gdzie podano lek jednorazowo lub czterokrotnie. Myszy były w stanie tolerować dawki nawet 20mg/kg masy ciała. Zabrakło mi pewnego odniesienia jak mają się te wyniki tolerancji dawki do oceny cytotoksyczności leku wobec badanych linii komórkowych (tam dane co do stężenia leku podane są w nanomolach). Czy w ogóle można z porównania tych doświadczeń wyciągnąć jakieś wnioski?

Praca doktorska mgr Aleksandry Sokołowskiej-Wędziny ma klasyczną budowę, choć nie do końca rozumiem ideę załączania na końcu pracy spisu legend wszystkich rysunków i liczby tabel zamieszczonych w pracy. Zamieszczono również streszczenie i podsumowanie, które tak naprawdę mówią o tym samym, a zabrakło mi wniosków dotyczących perspektywy dalszych badań.



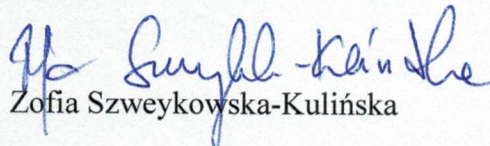


Praca jest napisana bardzo ładnym językiem (co ostatnio należy podkreślać bo co tu dużo mówić, osób piszących ładnie i logicznie w naszym języku ubywa...). Zdania są logiczne, jedno wynika z drugiego. Bardzo podoba mi się pomysł nakreślenia w kilku zdaniach idei większego doświadczenia przed każdym rozdziałem wyników. Ułatwia to znacząco śledzenie osiągnięć pracy, w której naprawdę zamieszczono ogromną ilość danych. Praca zresztą w całości przygotowana jest bardzo starannie. Mam pewien niedosyt gdy chodzi o dyskusję przeprowadzonych wyników gdyż w większej części stanowi ją streszczenie uzyskanych wyników.

Ciąg przeprowadzonych i wynikających z siebie badań jest imponujący, a warsztat metodyczny mgr Aleksandry Sokołowskiej-Wędziny znakomity i wszechstronny. W pracę włożono ogromny wysiłek, i to zarówno na etapie prowadzonych doświadczeń jak i przygotowywania samej rozprawy doktorskiej. Doktorantka ma w swoim dorobku naukowym dwie prace widoczne w bazie danych PubMed, które nie dotyczą badań przedstawionych w doktoracie. Natomiast z pewnością Kandydatka będzie współautorką patentu, a dopiero potem ukażą się prace dotyczące uzyskanych wyników doktoratu. Bardzo sekunduję badaniom mgr Aleksandry Sokołowskiej-Wędziny gdyż mogą doprowadzić do pojawienia się skutecznego leku antynowotworowego dla przynajmniej pewnej populacji chorych na raka płuc.

Z uwagi na bardzo dobre, ciekawe i nowe wyniki uzyskane w pracy doktorskiej zwracam się do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Aleksandry Sokołowskiej-Wędziny do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto z uwagi na imponującą liczbę i wagę uzyskanych wyników zwracam się do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o wyróżnienie mgr Aleksandry Sokołowskiej-Wędziny stosowną nagrodą.

  
Zofia Szwejkowska-Kulińska