

## **PUBLICZNA OBRONA PRACY DOKTORSKIEJ**

**Dnia 24 stycznia 2013 r. o godz.9<sup>30</sup>**

na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego  
w sali nr 170, parter, przy ul. Przybyszewskiego 63  
odbędzie się publiczna obrona rozprawy doktorskiej

**mgr Agnieszki Kobielałak**

pt.

**„Konstrukcja oraz charakterystyka stabilnych  
termodynamicznie i odpornych na proteolizę wariantów  
ludzkiego kwaśnego czynnika wzrostu fibroblastów o  
potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym.”**

Promotor     **Dr hab. Daniel Krowarsch**

Recenzenci   **Prof. dr hab. Andrzej Gamian**  
(Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej, PAN Wrocław)

**Dr hab.inż. prof. Piotr Dobryczycki**  
(Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska)

Praca do wglądu znajduje się w bibliotece Wydziału Biotechnologii  
przy ul. Przybyszewskiego 63



## INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

im. Ludwika Hirsfelda

Polska Akademia Nauk

ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław

tel. (4871) 370 9982, fax: (4871) 370 9975

<http://iitd.pan.wroc.pl>; e-mail: [gamian@iitd.pan.wroc.pl](mailto:gamian@iitd.pan.wroc.pl)

Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych

Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej

Prof. dr hab. Andrzej Gamian

Wrocław, 5.01.2013 r.

### Recenzja

rozprawy doktorskiej Mgr Agnieszki Kobielał pt. „Konstrukcja oraz charakterystyka stabilnych termodynamicznie i odpornych na proteolizę wariantów ludzkiego kwaśnego czynnika wzrostu fibroblastów o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym” wykonanej pod kierunkiem dr hab. Daniela Krowarscha

Białko FGF-1, ludzki kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów, to małe białko o dużym potencjale mitogennym, oddziałujące poprzez receptory na różnych komórkach lub bezpośrednio przez translokację do cytoplazmy lub samego jądra komórkowego, indukuje ekspresję szeregu genów. Uważa się, że ochronę przed proteolizą stanowi jego wiązanie z heparanami. Właściwości angiogenne, neurogenne i osteogenne stwarzają możliwości zastosowania FGF-1 w leczeniu wielu chorób. Dlatego podejmuje się próby ograniczenia podatności na proteolizę i zwiększenia stabilności tego białka, aby zwiększyć jego możliwości jako leku. Przedstawiona do oceny praca miała na celu odpowiedzieć na pytanie, czy zwiększenie odporności FGF-1 na proteolizę wydłuży jego aktywność biologiczną i koreluje ze wzrostem stabilności jego struktury, czyli czy polepszenie odporności na trypsynolizę będzie skorelowane z mniejszą degradacją *in vivo*. W pracy podjęto więc bardzo ważny problem uzyskania różnych wariantów czynnika wzrostu o różnej stabilności i podatności na proteolizę, zadanie zbadania efektów tych modyfikacji *in vivo*. Strategia badania uwzględniała użycie spektrometrii masowej do analizy produktów proteolizy, oraz oceny oddziaływania FGF-1 z białkami partnerskimi. Takie podejście pozwala na śledzenie zmian, tutaj odnoszących się do kontrolowanej ograniczonej proteolizy. Podjęty przez Mgr Agnieszka Kobielał temat pracy doktorskiej jest ważny z punktu widzenia biochemicznego i biomedycznego i w pełni uzasadniony. Otrzymanie stabilnych i odpornych na proteolizę wariantów fibroblastycznego czynnika wzrostu pozwoli na ich zastosowania praktyczne w terapii, także lepszego poznania jego udziału w procesach

fizjologicznych i patologicznych. Niniejsza praca stanowi kontynuację dobrze znanych w świecie badań nad strukturą i funkcją białek, proteaz i ich inhibitorów, prowadzonych w Instytucie Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego.

Praca ma typowy układ dla rozprawy doktorskiej, zawiera 140 stron maszynopisu, 52 rysunki i 5 tabel, dodatkowo 5 tabel i rysunków stanowią załączniki, natomiast na płycie pokazano dane odnośnie identyfikacji fragmentów masowych otrzymanych w różnych warunkach trypsynolizy poszczególnych wariantów. Osobno podano wykazy skrótów, rysunków i tabel, podsumowanie i streszczenie. Autorka cytuje 165 pozycji piśmiennictwa.

Wstęp pracy jest dobrze skonstruowany i napisany, najpierw autorka omawia zagadnienia metodyczne, warunki, mechanizmy i zastosowania ograniczonej proteolizy oraz techniki spektrometrii masowej elektrorozpylaniem oraz desorpcją/jonizacją laserową z udziałem matrycy. Następnie autorka wprowadza czytelnika w zagadnienia, które dotyczą przedmiotu badań, czynnika wzrostu fibroblastów, strukturę i funkcję tego białka, oddziaływanie z receptorami i heparanami, omawia translokację do komórki i aktywowane szlaki sygnałowe. Opisała też zagadnienia związane ze stabilnością FGF-1, możliwe zastosowania terapeutyczne.

Do realizacji zadań autorka użyła bogatego zestawu metod, dobrze i szczegółowo opisanych. Przy projektowaniu mutacji i konstruowaniu wariantów odpornych na proteolizę, wyboru podstawień dokonała na podstawie sekwencji białek homologicznych do FGF-1, ponadto wybrała podstawienia zapewniające stabilne struktury, po czym otrzymała czyste białka rekombinowane. Proteolizę wykonywała przy pomocy trypsyny oraz chymotrypsyną i ludzką elastazą leukocytarną. Degradację monitorowano metodą SDS-PAGE, fluorescencyjnie i przez pomiary dichroizmu kołowego, zarówno w funkcji temperatury jak i w obecności chlorku guanidyniowego oraz metodami spektrometrii masowej. Należy tutaj zaznaczyć, że wyniki otrzymane metodą SDS-PAGE korelowały z danymi uzyskanymi wprowadzoną przez autorkę analizą fluorescencyjną, przy czym metoda fluorescencyjna pozwoliła monitorować dokładniej proteolizę i w sposób ciągły. Wykazana przewaga metody fluorescencyjnej nie wyklucza jednak blotingu, gdyż obraz SDS-PAGE ujawnił proteolizę niewykrytą we fluorescencji. Analizę funkcjonalną czynników wzrostu wykonano oceniając mitogenność przez inkorporację do komórek trytowanej tymidyny, przez detekcję białek sygnałowych lub Hsp90 w komórkach i analizę SDS-PAGE/blotting produktów degradacji FGF-1. Dokumentacja wyników jest starannie opracowana i nie budzi zastrzeżeń. Autorka wykazała, że wariant K12T był stabilny, odporny na proteolizę trypsyną, aktywny w testach biologicznych, o zwiększonym okresie półtrwania *in vivo*. Mutant podwójny C117P/K118V wykazywał taką samą korelację odporności *in vitro* jak *in*



*vivo*. Wytypowane do podstawienia pozycje kluczowe dla trawienia trypsyną okazały się trafnym wyborem. Uwzględniono przy projektowaniu mutacji te reszty, które potencjalnie mogły podnieść stabilność i są zachowawcze. Uzyskano 10 czystych wariantów białka, określono ich stabilność w warunkach denaturacji chemicznej, mierzoną w CD i metodą fluorescencji. Dwa warianty były stabilniejsze od wyjściowego białka, a pięć wariantów było bardziej odpornych na trypsynolizę. Stabilność była skorelowana z odpornością na proteolizę z wyjątkiem najbardziej odpornych, gdzie doszło do lokalnych zmian w konformacji cząsteczki. Aktywność biologiczna, mitogenność i odporność na proteolizę wzrosła *in vivo*. Metodę ograniczonej proteolizy i oddziaływania białko-białko monitorowano też przy pomocy MALDI. Metoda jest przydatna gdy maleje ilość miejsc cięcia dla proteaz, lub zmienia się konformacja białka. MALDI wykorzystano do analizy oddziaływania z białkami Hsp90, p34. Dyskusja została przeprowadzona przejrzysto, zagadnienia są podzielone na podrozdziały tematyczne. Autorka przeprowadziła bardzo dobrą analizę wyników i trudności metodycznych. Wnioskuje na temat korelacji między stabilnością, a odpornością na proteolizę, że całkowita stabilizacja struktury nie jest jedyną przyczyną odporności na trypsynolizę, ważna jest zwłaszcza lokalna stabilizacja w części C-końcowej, istotna dla trypsynolizy. Ważną obserwacją, że odporność na trypsynolizę *in vitro* dobrze odzwierciedla podatność na proteazy w testach na komórkach, autorka interpretuje tym, że wymiana reszt wywołuje szerszy efekt, związany z usztywnieniem struktury. Metoda ograniczonej proteolizy w połączeniu ze spektrometrią masową okazała się bardzo dobrym narzędziem do badania oddziaływań białko-białko, której to interakcji nie przeszkadzała obecność substratu konkurencyjnego do trypsyny. Niezwykle interesujące wydają się wyniki otrzymane z użyciem techniki MALDI-MS, gdyż przy ograniczeniach tej metody, które autorka opisuje, uzyskała z bardzo dobrą powtarzalnością ilościowe dane.

Nie mam uwag krytycznych do pracy, błędy literowe są nieliczne. Zauważyłem jedynie niezgodność na rys. 1.7 i w tekście na str. 27 co do braku pozycji Arg122, która to reszta jest na rys. 6.1 a tekście na str. 98 jest Lys122, na str. 40 w met. 4.1.5 brak odnośnika, zamiast bufor PBS, lepiej byłoby używać w tekście PBS, gdyż sam skrót zawiera bufor, opis na str. 86 do rys. 5.26 jest niejednoznaczny, chciałbym aby autorka sprawdziła, czy dla ścieżki 7 powinno być frakcja „związana” zamiast „niezwiązanej”, na str. 119 zdanie urywa się, nie podano danych na temat stosowanych przeciwciał w immunoblotingu, warto podać informacje o ich pochodzeniu, by ocenić swoistość i porównać wyniki innych autorów. Uwagi powyższe nie umniejszają dużej wartości pracy, ale mogą być pomocne przy redagowaniu pracy do druku.

W podsumowaniu chcę podkreślić, że praca jest bardzo wartościowa, została prawidłowo zaplanowana i zrealizowana, wnosi oryginalny i istotny wkład do wiedzy o oddziaływaniach białko-białko, czynnika FGF-1 z heparyną, o wpływie białka Hsp90 na FGF-1, dostarczyła danych referencyjnych na temat struktury i funkcji białek, zastosowań metod spektrometrii masowej. Poza technikami biologii molekularnej, hodowli komórkowych, analizami biochemicznymi, autorka stosowała nowoczesne techniki spektrometrii masowej. Dzięki zastosowaniu tych metod i dużego wkładu pracy autorka uzyskała wzorowe wyniki. Wykazała się znajomością właściwie wykorzystanego piśmiennictwa. Dowodzi to bardzo dobrego opanowania warsztatu badawczego. Praca jest utrzymana w najwyższym standardzie badań wielofunkcyjnych makrocząsteczek biologicznych.

Uważam, że rozprawa doktorska Mgr Agnieszki Kobielał spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki. Wnoszę do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o przyjęcie tej pracy doktorskiej i dopuszczenie Mgr Agnieszki Kobielał do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Pozwalam sobie również złożyć Wysokiej Radzie wniosek o wyróżnienie tej pracy ze względu na dużą wartość merytoryczną i bardzo dobre wykonanie części doświadczalnej oraz napisanie całej rozprawy.

KIEROWNIK  
Zakładu Immunologii Chorób Zakaźnych  
*Andrzej Ganczarski*  
Prof. dr hab. Andrzej Ganczarski



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny  
dr hab. inż. Piotr Dobryczycki, prof. PWr.

Przewodniczący Rady Naukowej  
Wydział Biotechnologii  
Uniwersytet Wroclawski  
ul. Kuźnicza 35; 50-137 Wroclaw

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Kobielał „Konstrukcja oraz charakterystyka stabilnych termodynamicznie i odpornych na proteolizę wariantów ludzkiego kwaśnego czynnika wzrostu fibroblastów o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym”

Rozprawa doktorska mgr Agnieszki Kobielał „Konstrukcja oraz charakterystyka stabilnych termodynamicznie i odpornych na proteolizę wariantów ludzkiego kwaśnego czynnika wzrostu fibroblastów o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym” jest monografią przedstawiającą opis wykorzystania różnych technik biochemii, biofizyki i biologii molekularnej do przygotowania stabilnych wariantów ludzkiego kwaśnego czynnika wzrostu fibroblastów (FGF-1). Została przygotowana pod kierunkiem dr hab. Daniela Krowarscha w laboratoriach Zakładu Biotechnologii Białek Uniwersytetu Wroclawskiego, we współpracy z dr Małgorzatą Zakrzewską z Zakładu Inżynierii Białka (eksperymenty *in vivo* w Institute for Cancer Research w Oslo), która jak wynika z cytowanej literatury otworzyła tematykę badawczą opisaną w doktoracie.

Praca, licząca 140 stron, składa się z pięciu głównych rozdziałów (Wstęp, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusja). W 21 stronicowym Wstępie Autorka wprowadziła czytelników w strukturalne uwarunkowania ograniczonej proteolizy, jako narzędzia badania relacji struktura-funkcja białek, przedstawiła metodologię spektrometrii mas w kontekście analizy produktów trawienia peptydów i aktualny stan wiedzy dotyczący FGF-1, a w szczególności jego struktury, stabilności, interakcji z receptorami czynników wzrostu fibroblastów i heparyną, szlaków sygnalizacyjnych, w których uczestniczy FGF-1 i wreszcie jego potencjału terapeutycznego, co jest istotnym czynnikiem uzasadniającym podjęcie badań. Rozdział napisany jest jasno i przejrzysto. Jedyną uwagę mam do braku w spisie cytowanej literatury wymienionej w tekście na str. 17-tej pracy Sides i wsp. 2012, (prawdopodobnie chodzi o pracę z *J.Am.Soc.Mass Spectrom.*) i niezacytowaniu dwóch interesujących prac, które ukazały się prawdopodobnie podczas edycji doktoratu (Ruoyan Xu i wsp. Diversification of the structural determinants of fibroblast growth factor-heparin interactions; implications for binding specificity





## Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

dr hab. inż. Piotr Dobryczycki, prof. PWr.

2012 *JBC*, 287, 40061-40073. Andrew Beenken *J. Biol. Chem.* 2012 287: 3067-3078. Plasticity in Interactions of Fibroblast Growth Factor 1 (FGF1) N Terminus with FGF Receptors Underlies Promiscuity of FGF1). Byłbym wdzięczny za odniesienie się do obu publikacji w kontekście zaplanowanych miejsc modyfikacji i wyników pracy podczas publicznej obrony. Kwestią dyskusji może być stopień szczegółowości opisu różnych wariantów spektrometrii mas, kosztem np. innych metod poszukiwania i planowania potencjalnych miejsc modyfikacji, w szczególności tzw. mutagenezy *in silico* (np. w oparciu o pakiet RosettaDesign) w połączeniu z dynamiką molekularną (np. w programie AMBER), tym bardziej, że o ile wiem nie istnieje żadna ogólna strategia prowadzenia stabilizacji białek, a każdy przypadek trzeba rozpatrywać indywidualnie, dążąc do zwiększenia udziału oddziaływań hydrofobowych w rdzeniach białek, ilości wiązań wodorowych, mostków solnych i efektów entropowych, czy wreszcie ograniczenia miejsc proteolizy - oczywiście za każdym razem z zachowaniem funkcji białka. W przyszłości planując miejsca modyfikacji zwróciłbym również uwagę na cykl prac Ranganathana i wsp. (np. „Hot spots for allosteric regulation of protein surface *Cell*, 147, 2011), w których autorzy pokazali sektorową architekturę białek w oparciu o analizę ewolucyjną grup aminokwasów, a nie pojedynczych reszt.

Bezpośrednio po Wstępie jasno został określony cel pracy związany z otrzymaniem odpornych na proteolizę wariantów FGF-1 poprzez usunięcie miejsc najbardziej podatnych na trawienie.

Na kolejnych 20-ciu stronach zostały opisane używane materiały i techniki badawcze wykorzystane w pracy. Nie mając większych zastrzeżeń do dobrze napisanego rozdziału z obowiązku recenzenta poniżej przedstawiam kilka uwag, które nasunęły mi się podczas czytania tego fragmentu. Jeżeli korzysta się z oprogramowania typu Refworks to wypada później skontrolować cytowania. Na str. 40-tej pojawił się komunikat „Błąd! nie można znaleźć cytowania”. Dość wesoło brzmi fragment „wybuchowy substrat trypsyny” będący kalką angielskiego określenia odnoszącego się do początkowej fazy reakcji katalizowanej przez proteazy serynowe. Stwierdzenie (str. 45), że wzrost emisji fluorescencji Trp przy 353nm oznacza rozwijanie struktury białka jest co najmniej dyskusyjne. Taka długość fali emisji oznacza, że ta reszta już jest silnie eksponowana do środowiska, i raczej nie może służyć jako dobry „marker” procesu rozfałdowywania, które nb. powinno przesuwając maksimum emisji w stronę nieco wyższych wartości. Natomiast oczywiście zmiana intensywności świadczy o różnicach w mikrootoczeniu Trp wynikających, o czym pisze Autorka, z ograniczenia wygaszania reszty przez Pro121 i His102. Natomiast zupełnie nie rozumiem dlaczego wybrano



## Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

dr hab. inż. Piotr Dobryczycki, prof. PWr.

długość fali wzbudzenia równą 280 nm, przy której „widać” przede wszystkim osiem reszt tyrozylowych, praktycznie nieczułych na zmiany mikrootoczenia, a nie jedyną resztę tryptofanową. Należało użyć wzbudzenia 295 nm, przy którym sygnał pochodziłby tylko od tryptofanu i byłby znacznie wyraźniejszy niż na Rys. 5.9. Widma CD zapewne rejestrowano w kuwetach 1mm, a nie 1cm co powtarza się w kilku miejscach w pracy.

Na kolejnych 40 stronach przedstawiono wyniki badań. Autorka każdorazowo stosowała bardzo wygodny dla czytelnika schemat: krótko przedstawiony cel eksperymentu, wynik i wniosek; zwracają również uwagę czytelne rysunki (np. Rys. 5.1 – 5.6), które logicznie uzasadniają kryteria wyboru miejsc modyfikacji. Szczegółowo opisano serię eleganckich eksperymentów ograniczonej proteolizy przy pomocy trypsyny, chymotrypsyny i elastazy z analizą MS, a wyniki skonfrontowano z częstością występowania reszty w danej pozycji wyznaczoną przez homologię 140 sekwencji FGF-1. Autorka otrzymując ostatecznie 10 wariantów białka zastosowała, dość rzadkie, ale w pełni uzasadnione podejście, zgodnie z którym prowadziła podstawienia na różne, logicznie uzasadnione aminokwasy, a nie typowo - na reszty alanylowe. Pewne wątpliwości budzą widma CD (Rys. 5.10), które są z niezrozumiałych powodów mało wiarygodne poniżej 210 nm i dlatego prawdopodobnie nie przeprowadzono analizy zawartości struktur drugorzędowych w oparciu o sieciowo dostępne pakiety jak CD-Pro. Tak czy inaczej zgadzam się z wnioskiem, że jedynie wariant K12Y nieco odbiegał od pozostałych. Z drobniejszych uwag dotyczących części wynikowej wskazałbym brak jednostek w tabeli 3, brak odchyłeń standardowych na rysunku 5.12, szczególnie, że w tym przypadku mamy do czynienia z danymi przeliczonymi ze stosunkowo mało dokładnych pomiarów. Nie rozumiem dlaczego na str. 73 napisano, że pięć spośród siedmiu wariantów podniosło stabilność konformacyjną. Wg mnie tylko trzy. Wydaje się, że Autorka powinna wyraźnie podkreślić np. w Dyskusji, że wyniki analiz wpływu temperatury i denaturanta chemicznego w przypadku badań FGF-1 stanowią jedynie uzupełnienie głównego nurtu, gdyż w obu przypadkach projektowanie mutantów wiąże się z innymi przesłankami i w związku z tym odporność GdmCl nie musi mieć związku z odpornością na wysokie temperatury i w końcu oba czynniki z odpornością na proteazy.

Rozdział 5.8 w pracy poświęcono charakterystyce biologicznej stabilnych wariantów FGF-1. Zawiera on niezwykle ważne i interesujące wyniki analizy poziomu fosforylacji białek skojarzonych z FGF-1, stymulacji syntezy DNA i degradacji proteolitycznej *in vivo* i stanowią w kontekście doktoratu jedynie jego uzupełnienie gdyż, jak zrozumiałem, zostały otrzymane przez dr Zakrzewską w Norwegii. Bez wątplenia





## Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

dr hab. inż. Piotr Dobryczycki, prof. PWr.

zebrane razem staną się podstawą wartościowej publikacji i dobrze się stało, że umieszczono je w doktoracie. Kolejny, interesujący i ważny fragment pracy dotyczy analizy oddziaływań wariantów FGF-1 z partnerami białkowymi metodą ograniczonej proteolizy skojarzonej z analizą MS. Interpretacja wyników nie budzi moich wątpliwości. Można się jedynie zastanowić nad przyczynami stabilizującego wpływu fragmentu „coiled-coil” białka p34, które samo ulega bardzo szybkiemu trawieniu, na FGF-1. Być może taką rolę może pełnić jakiś wybrany fragment badanej domeny p34.

Dalsze 23 strony to Dyskusja, która, podobnie jak poprzednie rozdziały została napisana jasno, przejrzysto, dobrym językiem i bez większych potknięć. Na szacunek zasługuje wyraźne zaznaczenie roli poprzedników i współautorów całego projektu i wyraźne zaznaczenie własnych wyników. Cel pracy został osiągnięty, chociaż oczywiście można dyskutować nad wpływem *in vivo* innych proteaz na FGF-1 niż wybrane do badań. Autorka słusznie zwraca uwagę na korelację wybranych miejsc mutacji z odpornością na proteolizę, chociaż wniosek o przewadze techniki fluorescencyjnej nad SDS-PAGE do monitorowania zmian konformacyjnych podczas trawienia (str. 108-109) w kontekście dość nietypowego zachowania się widma emisji FGF-1 jest wątpliwy. Gdyby dysponowano wariantem z resztą tryptofanową emitującą w zakresie 305-350 nm to bez wątpienia Autorka miałaby rację. Z ciekawszych wyników na podkreślenie zasługuje określenie roli mutacji Lys-118-Val w usztywnieniu C-końcowego fragmentu białka, który jak się okazało jest kluczowy dla proteolizy. Autorka, dość nietypowo, przedstawiła część wyników w Dyskusji (np. Rys 6.6-6.8), ale biorąc pod uwagę ich wybór dotyczący opisu globalnej stabilności białka i mikrootoczenia miejsc trawienia w odniesieniu do miejsc proteolizy jest to do przyjęcia. Wydaje się, że wobec ograniczeń metody MS dotyczących określenia regionów oddziaływań białko-białko można było, przynajmniej w Dyskusji, zaproponować metody alternatywne. Z uchybień zwróciłbym uwagę ponownie na brak jednostek przy stałych asocjacji (str. 116, 117).

Podsumowując, rozprawa doktorska pani mgr Agnieszki KobielaK zawiera ogromny materiał eksperymentalny, ma dużą wartość poznawczą. Doktorantce udało się zrealizować cele badawcze. Praca stanowi przykład efektywnego wykorzystania współpracy. Uzyskane wyniki mają dużą wartość naukową, stanowią oryginalne rozwiązanie istotnego problemu. Doktorantka musiała opanować zarówno techniki biologii molekularnej, biochemii jak i biofizyki. Co ważne, badania są bezpośrednią kontynuacją doświadczeń zespołów kierowanych przez prof. Jacka Otlewskiego i Promotora pracy, a jednocześnie stanowią świetny punkt wyjścia dla kolejnych badań,



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

dr hab. inż. Piotr Dobryczycki, prof. PWr.

mających na celu otrzymanie stabilnego w warunkach *in vivo* i w pełni aktywnego biologicznie białka do zastosowań terapeutycznych. W pracy znalazłem wyjątkowo mało błędów literowych, co świadczy o bardzo starannej korekcie pracy.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Agnieszki Kobielał spełnia wymagania ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym, stanowi oryginalne rozwiązanie naukowe, wykazuje wiedzę teoretyczną Autorki i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Agnieszkę Kobielał do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

dr hab. inż. Piotr Dobryczycki , prof. PWr

## STRESZCZENIE

Przedmiotem badań przedstawionym w poniższej pracy jest ludzki, kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów (FGF-1). Białko to jest silnym mitogenem, odpowiedzialnym za aktywację wielu procesów życiowych w różnych typach komórek. Ze względu na swoje właściwości angiogenne, neuroprotektoryjne oraz osteogenne, FGF-1 ma wysoki potencjał terapeutyczny. Jednakże niska stabilność oraz podatność na degradację proteolityczną w znacznym stopniu ograniczają możliwość jego zastosowania w leczeniu.

Głównym celem niniejszej pracy było otrzymanie wariantów FGF-1 o podwyższonej odporności na działanie proteaz, poprzez wprowadzenie podstawień w pozycjach kluczowych dla przebiegu degradacji czynnika wzrostu. Regiony w strukturze białka podatne na działanie enzymów proteolitycznych określono wykorzystując metodę ograniczonej proteolizy FGF-1 trypsyną, chymotrypsyną oraz ludzką elastazą leukocytarną połączonej z analizą przez spektrometrię mas. Kolejność rozpoznawania oraz zlokalizowanie reszt kluczowych dla przebiegu degradacji głównie w obrębie C-końcowego regionu białka wskazuje na znaczny udział mobilności regionów otaczających miejsce cięcia w determinowaniu przebiegu hydrolizy FGF-1. Do podstawień wybrano pozycje kluczowe dla proteolizy trypsyną. Przy projektowaniu mutacji oparto się na strategii zakładającej, że reszty, które mają największy wpływ na stabilność są najbardziej zachowywane wśród sekwencji homologicznych białek. Pozwoliło to na wybór podstawień zachowujących bądź potencjalnie podnoszących stabilność FGF-1. Z zaprojektowanych 12 wariantów, uzyskano 10 o wysokim stopniu czystości. Dla wszystkich wariantów przeprowadzono analizę stabilności poprzez denaturację termiczną, monitorowaną poprzez pomiar dichroizmu kołowego oraz fluorescencji. Spośród 10 wariantów 2 były stabilniejsze od typu dzikiego, a tylko 3 były wyraźnie mniej stabilne, co świadczy o efektywności metody przyjętej przy ich projektowaniu. Wszystkie warianty charakteryzowano pod kątem ich podatności na proteolizę trypsyną. Wśród pięciu mutantów bardziej odpornych na proteolizę od dzikiego typu białka, trzy charakteryzowały się kilkudziesięciokrotnym wydłużeniem okresu półtrwania w środowisku proteolitycznym. Dla większości wariantów wykazano korelację między stopniem podatności na proteolizę a stabilnością struktury. Brak tej korelacji w przypadku wariantów najbardziej odpornych na degradację, wskazuje na istotny wpływ lokalnych zmian w strukturze o charakterze entropowym. Dla części wariantów przeprowadzono dodatkowo charakterystykę aktywności biologicznej. Wykazała ona wzrost zarówno aktywności mitogennej wariantów jak i ich odporności na działanie proteaz zewnątrz-, i wewnątrzkomórkowych względem dzikiego typu białka. Ponadto, uzyskane wyniki wskazują, że charakterystyka odporności proteolitycznej wariantów FGF-1 przeprowadzona w oparciu o degradację trypsyną dobrze odzwierciedla ich podatność na trawienie proteolityczne *in vivo*.

W pracy przedstawiono również badania nad wykorzystaniem metody ograniczonej proteolizy połączonej z analizą przez spektrometrię mas typu MALDI do weryfikacji oddziaływań białko-białko. Wybierając tą metodę przyjęto założenie, że w skutek ograniczenia dostępności miejsc cięcia dla proteazy oraz zmian w dynamice struktur białek w regionie kontaktu, nastąpi zmiana profilu degradacji białek. Wykorzystując tą technikę udało się potwierdzić zachodzenie oddziaływania między FGF-1 i jego partnerami wewnątrzkomórkowymi – domeną coiled-coil białka p34 oraz z podjednostką alfa kinazy kazeinowej. Ponadto zaobserwowane różnice w przebiegu degradacji FGF-1 w obecności białka Hsp90 potwierdziły zachodzenie oddziaływania, które do tej pory było tylko przypuszczeniem. Uzyskane wyniki potwierdziły, że przyjęta metoda może służyć do przesiewowej analizy oddziaływań białko-białko.