



## INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

im. Ludwika Hirszfelda

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, 14.10.2014 r.

### Recenzja

rozprawy doktorskiej Mgr Michała Kostasia pt. „Udział fibroblastycznych czynników wzrostu 1 i 2 (FGF1 i FGF2) w procesie apoptozy” wykonanej pod kierunkiem dr hab. Daniela Krowarscha

Praca dotyczy poznania metodami biochemicznymi mechanizmu antyapoptotycznego działania dwóch fibroblastycznych czynników wzrostu FGF1 i FGF2. Białka te uczestniczą w angiogenezie, wielu procesach fizjologicznych, ale także w rozwoju nowotworów. Podjęty problem jest ważny dla poznania mechanizmów działania tych czynników wzrostowych, zwłaszcza, gdy obserwuje się wiele fizjologicznych i patologicznych procesów, w których te białka uczestniczą. Są to wielofunkcyjne cząsteczki, oddziałujące poprzez receptory na różnych komórkach lub przez translokację do cytoplazmy i jądra komórkowego. Właściwości angiogenne, neurogenne i osteogenne stwarzają możliwości ich zastosowania w leczeniu wielu chorób. Przedstawiona do oceny praca miała na celu określenie oddziaływań translokowanych czynników FGF1 i FGF2 z białkami partnerskimi w cytoplazmie i zbadanie, niezależnego od aktywacji receptora powierzchniowego, szlaku odpowiedzialnego za przeżywalność komórek w warunkach stresowych i określenie wpływu na apoptozę. Postawienie takiego celu pracy było zasadne, gdyż odpowiedź na te pytania może pomóc zrozumieć i potwierdzić także między innymi udział tych czynników w procesach zapalnych. Niektóre z czynników Toll-podobnych funkcjonują także z udziałem receptorów lub poprzez translokację. Antyapoptotyczna rola tych czynników wzrostu może oznaczać udział w nowotworzeniu. Podejście do badań uwzględniło użycie wielu swoistych inhibitorów kinaz i czynników hamujących proces translokacji, co w połączeniu z metodami analiz oddziaływań międzycząsteczkowych pozwoliło na śledzenie poszczególnych etapów działania czynników wzrostu. Podjęty przez Mgr Michała Kostasia temat pracy doktorskiej jest ważny z punktu widzenia biochemicznego i biomedycznego i w

pełni uzasadniony. Poznanie udziału w procesach fizjologicznych i patologicznych fibroblastycznych czynników wzrostu FGF1 i FGF2 pozwoli także na zastosowania praktyczne tej wiedzy w terapii. Niniejsza praca jest kontynuacją dobrze znanych w świecie badań prowadzonych w Instytucie Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego nad strukturą i funkcją białek.

Praca ma typowy układ dla rozprawy doktorskiej, zawiera 131 stron maszynopisu, 23 rysunki, dodatkowo załącznik pokazujący zakresy bramkowania w cytometrii przepływowej. Osobno podano wykazy skrótów, rysunków i streszczenie w języku polskim i angielskim. Autor cytuje 333 pozycje piśmiennictwa.

Wstęp pracy jest bardzo dobrze napisany, najpierw autor omawia fibroblastyczne czynniki wzrostu, ich receptory, aktywację wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych, zagadnienia wydzielania endogennych czynników wzrostu, następnie translokację do cytozolu i jądra komórkowego, transport wewnątrzkomórkowy z omówieniem białek wiążących FGF1 i FGF2 opisanych przez innych autorów, jak też poznanych we własnym Instytucie. Opisuje następnie fizjologiczną rolę FGF1 i FGF2, udział w procesach nowotworowych i procesach apoptozy. Interesującym byłoby wyjaśnienie roli glikozylacji tych czynników, o której wspomina autor, gdyż tutaj może tkwić przyczyna niewyjaśnionych funkcji, być może aberracje glikozylacji/deglikozylacji uczestniczą w nowotworzeniu i metastazie. Do realizacji zadań autor użył bogatego zestawu metod, dobrze i szczegółowo opisanych. Pod względem formy wszystkie części pracy są bardzo przejrzyste napisane, co jest dużym ułatwieniem dla czytelnika. Zastosowano metodę *pull-down* do analizy oddziaływań FGF z białkami partnerskimi, polegającą na izolacji kompleksów tych białek za pomocą cząstek magnetycznych ze streptawidyną i po zwolnieniu z kompleksów były poddane analizie metodą blotingu. Wewnątrzcząsteczkowe białka partnerskie badano także w bezpośrednich oddziaływaniach używając ich w formie białek rekombinowanych. Stosowano metody biologii molekularnej, elektroforezę w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS, biotynylację białek, spektrometrię MALDI-TOF, pomiary widm fluorescencji i dichroizmu kołowego i powierzchniowy rezonans plazmonowy. W celu zahamowania aktywności receptorów FGF zastosowano inhibitory ich aktywności kinazowej, a zahamowanie translokacji z endosomów do cytozolu i jądra komórkowego uzyskano również z użyciem swoistych inhibitorów. Indukcję i badanie apoptozy zrealizowano przez analizę w cytometrii przepływowej i pomiar aktywności kaspaz, na modelu linii fibroblastów mysich i ludzkich, oraz dwóch linii bez receptora FGFR. Dokumentacja wyników jest starannie opracowana i nie budzi zastrzeżeń. Autor wykazał oddziaływanie FGF1 i FGF2 z

białkami p53, MDM2, PCAF (acetylotransferazą histonów), UACA, sirtuiną 1 i CDK4 (kinazą cyklino-zależną). Interesującym pytaniem jest, czy kaweolina bierze udział w endosomalnej translokacji czynników wzrostu FGF. Następnie wykazano, że egzogenne białka FGF1 i FGF2 niezależnie od aktywacji receptorów FGF, w wyniku translokacji wpływają hamująco na proces apoptozy. Po zahamowaniu translokacji z endosomów do cytozolu z równoczesnym hamowaniem aktywności FGFR, antyapoptotyczna aktywność nie była obserwowana, który to efekt był znoszony po użyciu moenzyny neutralizującej wpływ inhibitora translokacji. Oznacza to, że antyapoptotyczna aktywność FGF1 i FGF2 jest związana z translokacją tych czynników do cytozolu i jądra komórkowego. Dalszym potwierdzeniem tych wyników było wykazanie, że endogennie wytwarzane czynniki FGF1 i FGF2 w transfekowanych komórkach hamują apoptozę indukowaną przez stauroporinę. Autor wysnuwa hipotezę, że rolą translokacji tych białek do cytozolu i jądra komórkowego jest zwiększenie przeżywalności komórek w niekorzystnych warunkach.

Dyskusja została przeprowadzona przejrzysto, zagadnienia są podzielone na podrozdziały tematyczne. Autor bardzo dobrze przeprowadził analizę wyników i trudności metodycznych, uzasadnienie doboru metod, inhibitorów, ścieżek i warunków eksperymentalnych. Poszczególne wyniki były potwierdzane kilkoma sposobami, każdorazowo w konfrontacji z danymi literaturowymi. Zastosowanie swoistych inhibitorów okazało się dogodnym narzędziem do badania apoptozy, a technika *pull-down* wraz z innymi metodami, pozwoliła na określenie charakteru oddziaływań czynników wzrostu z białkami partnerskimi.

Nie mam uwag krytycznych do pracy, błędy literowe są nieliczne. Zauważyłem jedynie kilka drobniejszych nieścisłości, które warto zaznaczyć, mianowicie PBS to zbuforowany roztwór soli fizjologicznej, brak informacji jaki rodzaj heparyny nisko- czy wysoko-cząsteczkowej używano w badaniach, o ile tutaj ma to znaczenie, gdyż różne typy heparyny mają odmienne właściwości biologiczne. Nie jest jasne czy rysunki 1-4 i 22 są własne, czy modyfikacją od innych autorów? Oporność na chemioterapię zamiast odporność (str. 26, 27, 97), elektroforeza poliakrylamidowa (str. 39) czy poliakryloamidowa (str.43), tutaj ważniejszy jest jednolity zapis, Western Blotting czy immunoblotting. O ile wiele metod opiera się w pracy na gotowych zestawach odczynnikowych, to jednak brak piśmiennictwa do kilku metod. Uwagi powyższe nie umniejszają wartości pracy, ale mogą być pomocne w redagowaniu manuskryptu.

Podsumowując należy podkreślić, że praca jest bardzo wartościowa, została prawidłowo zaplanowana i zrealizowana, wnosi oryginalny i istotny wkład do wiedzy o oddziaływaniach czynników wzrostu, stanowi podstawę do badań białek partnerskich w kontekście oddziaływania

z FGF1 i FGF2, wpływem glikozylacji, a także nowymi aspektami szlaków aktywowanych przez produkty glikacji. Autor uzyskał bardzo dobre wyniki dzięki zastosowaniu nowoczesnych metod i dużego wkładu pracy. Dowodzi to bardzo dobrego opanowania warsztatu badawczego. Wykazał się znajomością właściwie wykorzystanego piśmiennictwa. Praca jest utrzymana w najwyższym standardzie badań wielofunkcyjnych makrocząsteczek biologicznych.

Uważam, że rozprawa doktorska Mgr Michała Kostasia spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Wnioskuje do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o przyjęcie tej pracy doktorskiej i dopuszczenie Mgr Michała Kostasia 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 Gosiński*  
Prof. dr hab. Andrzej Gosiński