



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

Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych
Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej
Prof. dr hab. Andrzej Gamian

Wrocław, 26.08.2019 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Justyny Tomali pt. „Analiza wewnątrzkomórkowej antyapoptotycznej aktywności fibroblastycznych czynników wzrostowych 1 i 2 (FGF1 i FGF2)” wykonanej pod kierunkiem dr hab. Daniela Krowarscha

Fibroblastyczne czynniki wzrostu są białkami, które uczestniczą w wielu procesach fizjologicznych, w tym w angiogenezie, ale także w rozwoju nowotworów. Są to białka wielofunkcyjne, oddziałujące poprzez receptory na różnych komórkach lub przez translokację do cytoplazmy i jądra komórkowego. Czynniki wzrostu fibroblastów 1 i 2 (kwaśny FGF1 i zasadowy FGF2) wiążą się do receptorów, i jak już wykazano w Instytucie Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, są także translokowane do wnętrza komórek, posiadają właściwości antyapoptotyczne i oddziałują z białkami zaangażowanymi w proces zaprogramowanej śmierci komórek. Nie jest jasna ich rola w komórce i transport poza komórkę. Praca dotyczy badania wewnątrzkomórkowej antyapoptotycznej aktywności FGF1 i FGF2 i jest kontynuacją prowadzonych w Instytucie Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego badań nad strukturą i funkcją białek, w tym fibroblastycznych czynników wzrostu. W Zakładzie Inżynierii Białka i Zakładzie Biotechnologii Białek odkryto szereg białek partnerskich dla FGF1 i FGF2 i kilka z zaangażowanych w procesie apoptozy jest przedmiotem obecnej pracy. Podjęty przez Mgr Justynę Tomalę temat pracy doktorskiej jest ważny z punktu widzenia biochemicznego i biomedycznego i w pełni uzasadniony. Poznanie udziału w procesach fizjologicznych i patologicznych czynników wzrostu FGF1 i FGF2 ma znaczenie podstawowe i pozwoli także na zastosowania praktyczne tej wiedzy w poszukiwaniu celów terapeutycznych. Praca ma typowy układ dla rozprawy doktorskiej, zawiera 131 stron maszynopisu, wstęp jest poprzedzony wykazem skrótów i streszczeniem w języku polskim, następnie określono cel pracy, po czym

następuje spis użytych materiałów i metod, opis wyników, ich dyskusję i spis cytowanego piśmiennictwa. Praca zawiera 34 rysunki, 3 tabele i 226 pozycji piśmiennictwa. We wstępie do rozprawy autorka omawia rodzinę fibroblastycznych czynników wzrostu ze szczególnym uwzględnieniem FGF1 i FGF2 oraz ich receptory, następnie opisuje wewnątrzkomórkowe szlaki aktywowane przez fibroblastyczne czynniki wzrostu i transport FGF1 i FGF2 w obrębie komórki. Osobno opisuje zaprogramowaną śmierć komórki zwracając szczególną uwagę na apoptozę, z omówieniem jej poszczególnych szlaków, następnie przedstawia białka partnerskie dla FGF1 i FGF2 które biorą udział w apoptozie i są przedmiotem pracy doktorskiej. Wstęp jest dobrze napisany, autorka wspomina też o acetylacji/deacetytacji i tutaj interesujące byłyby informacje czy zachodzi aminoacylacja tych czynników, gdyż może być przyczyną niewyjaśnionych funkcji, a problem aminoacylacji/deaminoacylacji pozostaje do wykazania, również w nowotworzeniu i metastazie. Celem pracy było określenie wewnątrzkomórkowej roli FGF1 i FGF2 w procesie apoptozy poprzez przybliżenie wpływu FGF1 i FGF2 na proces apoptozy indukowany różnymi czynnikami i przebiegający za pośrednictwem różnych szlaków. Istotnym pytaniem było wyjaśnienie podstaw antyapoptotycznych właściwości tych czynników. Droga dojścia do tego celu była analiza oddziaływania FGF1 i FGF2 z wewnątrzkomórkowymi białkami partnerskimi, zaangażowanymi w proces apoptozy. Zadanie realizowano stosując bogaty zestaw metod, odczynniki, wektory, przeciwciała i koniugaty, białka rekombinowane, zestawy testowe, materiały do badania apoptozy i pożywki pochodzenia komercyjnego. Autorka oceniała apoptozę metodą cytometrii przepływowej, indukcję, hamowanie i wpływ FGF1 i FGF2, stosując odpowiednie zestawy odczynników. Doświadczenia prowadzono z użyciem komórek linii NIH 3T3 mysich fibroblastów pochodzenia embrionalnego, u których występuje ekspresja receptora FGFR1. Rekombinowane białka uzyskiwano z bakterii, oczyszczano na kolumnach powinowactwa i analizowano metodami elektroforezy SDS-PAGE, spektroskopii fluorescencyjnej, CD, spektrometrii masowej MALDI-TOF/TOF. Oddziaływania międzycząsteczkowe białek analizowano techniką powierzchniowego rezonansu plazmonowego, a z przeciwciałami metodą immunoblotingu. Do wyciszania genów niektórych białek zastosowano specyficzne małe interferujące RNA. Wyniki poddano w sposób wystarczający analizie statystycznej. Dokumentacja wyników jest starannie opracowana i nie budzi zastrzeżeń. Autorka oczyściła 18 wariantów mutacyjnych FGF1 i FGF2 z wcześniej przygotowanych konstruktów, oczyściła także rekombinowaną proteazę wirusa TEV używaną jako narzędzie do odcinania metek GST od rekombinowanych białek, ponadto oczyściła fragment C-końcowy nukleoliny do badań metodą SPR. Analiza fluorescencyjna i CD wykazała, że nadprodukowane

warianty FGF1 oraz FGF2 mają natywną konformację. Następnie przeprowadzono analizę SPR oddziaływania rekombinowanych wariantów FGF z 8 immobilizowanymi białkami partnerskimi, co pozwoliło wykazać, że białka p53, MDM2, PCAF, UACA, SIRT1, CDK4, MYL9, nukleolina i Hsp90 mogą tworzyć kompleksy z FGF1 i FGF2, sugerując wpływ tych czynników na przeżywalność komórek. Badanie hamującego wpływu FGF1 i FGF2 na proces apoptozy w komórce wykazało, że fosforylacja białka FGF1 przez kinazę PKC δ , i w konsekwencji eksport z jądra komórkowego może mieć wpływ na antyapoptotyczne właściwości tego białka. Wynik ten uzyskano przez porównanie z nieulegającym fosforylacji FGF2 i z wariantami mutacyjnymi oraz użyciem inhibitora aktywności kinazowej receptora. Następnie zastosowano technikę wyciszania genów dla trzech białek partnerskich nukleoliny, SIRT1 oraz nukleofosminy i wykazano, że wyciszenie nukleoliny, nukleofosminy lub sirtuiny1 nie znosi hamującego wpływu FGF1 i FGF2 na proces apoptozy. Natomiast dane otrzymane po "wyciszeniu" ekspresji białek biorących udział w imporcie FGF1 i FGF2 do jądra komórkowego (odpowiednio LRRC59 i translokiny), wykazują, że oddziaływanie z nimi jest konieczne do zachowania antyapoptotycznych właściwości FGF1 i FGF2. Mutacje zaburzające oddziaływanie z nukleoliną i nie eksportowane z jądra komórkowego do cytoplazmy, dają w efekcie zwiększenie właściwości antyapoptotycznych, większe niż dzikiego FGF1 lub takie samo jak dzikiego FGF2. Analizę szlaków apoptozy przeprowadzono z zastosowaniem specyficznych inhibitorów kompetycyjnych dla kaspaz inicjatorowych trzech szlaków: wewnętrznego, zewnętrznego i szlaku stresu ER, blokując dwa z trzech wymienionych szlaków z indukcją apoptozy induktorem specyficznym dla trzeciego ze szlaków. Wewnętrzny (zależny od mitochondriów, indukowany przez H₂O₂) szlak apoptozy jest hamowany przez oba czynniki, ale wydajniej przez FGF2. Podobny efekt zauważono przy hamowaniu zewnętrznego procesu apoptozy, indukowanego przy pomocy liganda Fas (zależnego od receptorów śmierci). Natomiast zupełny brak hamowania przez FGF1 i FGF2 obserwowano w badaniach z wykorzystaniem tapsygarginy jako induktora apoptozy przebiegającej na drodze szlaku stresu ER. Z kolei wyciszenie ekspresji białka LRRC59 odpowiedzialnego za transport do jądra FGF1 i translokiny odpowiedzialnej za import FGF2 wskazuje na ich rolę w hamowaniu apoptozy.

Dyskusja jest klarownie napisana, zagadnienia są podzielone na podrozdziały tematyczne. Autorka bardzo dobrze przeprowadziła analizę wyników, które były potwierdzane kilkoma sposobami. Analiza SPR wskazała na ewolucyjnie zachowany obszar na powierzchni cząsteczki czynników wzrostu fibroblastów zaangażowany w oddziaływanie z partnerskimi białkami wewnątrzkomórkowymi, także z heparyną i receptorem. Autorka wnioskuje stąd, że istnieje

skomplikowany mechanizm biologiczny zapewniający rozdzielenie w czasie oraz przestrzeni wewnątrzkomórkowej aktywności biologicznej FGF1 oraz FGF2, pozwalające zahamować apoptozę, umożliwiające przeżywanie komórek w warunkach stresowych. Doświadczenia prowadzono po zahamowaniu aktywności receptora przez inhibitor. Autorka wysnuwa tezę, że zdolność do zwiększania żywotności komórek przez FGF1 i FGF2 jest następstwem lokalizacji jądrowej, a wydłużenie czasu przebywania w jądrze potęguje hamowanie procesu apoptozy.

Nie mam uwag krytycznych do pracy, błędy literowe są nieliczne, tytuł jest zgodny z treścią pracy. Pod względem formy wszystkie części pracy są bardzo przejrzyste napisane. Zauważyłem jedynie kilka drobniejszych nieścisłości, które warto zaznaczyć, mianowicie brak informacji jaki rodzaj heparyny używano w badaniach, o ile wiele metod opiera się w pracy na gotowych zestawach odczynnikowych, czy własnych opracowanych metodach, to jednak brak piśmiennictwa do kilku metod. Daje się także zauważyć niewiele odnośnień do literatury w części dyskusyjnej pracy. Niepotrzebnie powtórzono w dyskusji tabelę 1. Dość duża jest niekonsekwencja zapisu w pozycjach piśmiennictwa, brak danych w pozycjach 19, 31, 46, 181, powtórzono pozycję 60 i 61. Na stronie 90 chyba błędnie podano ...FasL w stężeniu 500 mg/ml... Natomiast interesująco brzmi ...Analiza widm emisji fluorescencji..., można by to sformułowanie wykorzystać przy opisie widm. Uwagi powyższe nie umniejszają wartości pracy, ale mogą być pomocne w redagowaniu manuskryptu.

Podsumowując chcę podkreślić, że praca jest wartościowa, badania zostały prawidłowo zaplanowane i zrealizowane, praca wnosi oryginalny wkład do wiedzy o oddziaływaniach czynników wzrostu, stanowi podstawę do dalszych badań białek oddziałujących z FGF1 i FGF2, a także nowymi aspektami, w tym szlaków aktywowanych przez produkty glikacji, czy badań mogących też uwzględniać aminoacylację jako sygnał komórkowy. Autorka uzyskała bardzo dobre wyniki dzięki zastosowaniu nowoczesnych metod i dużego wkładu pracy, co dowodzi bardzo dobrego opanowania warsztatu badawczego. Autorka wykazała się znajomością właściwie wykorzystanego piśmiennictwa, na uwagę zasługuje bardzo dobre opanowanie metod badań komórkowych, immunochemicznych i genomicznych.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr Justyny Tomali zawiera oryginalny materiał doświadczalny, 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.). Dlatego wnioskuję do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o przyjęcie tej pracy doktorskiej i dopuszczenie mgr Justyny Tomali do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakładu Immunologii Chorób Zakaźnych

Prof. dr hab. Andrzej Gamian