



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

im. Ludwika Hirszfelda

Polskiej Akademii Nauk

Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący

Centrum Doskonałości: IMMUNE

dr hab. Jacek Rybka, prof. IITD PAN
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN
im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu
ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław
email: jacek.rybka@hirszfeld.pl

Wrocław, 19 września 2019

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Justyny Tomali:

„Analiza wewnątrzkomórkowej antyapoptotycznej aktywności fibroblastycznych czynników wzrostowych 1 i 2 (FGF1 i FGF2)”

Promotor: dr hab. Daniel Krowarsch

Przedstawiona do recenzji praca mgr Justyny Tomali stanowi kontynuację badań prowadzonych na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, dotyczących struktury i funkcji czynników wzrostu fibroblastów. Czynniki wzrostu fibroblastów to rodzina ponad dwudziestu białek, wykazujących podobieństwo strukturalne i pokrewieństwo ewolucyjne, uczestniczących w różnorodnych procesach związanych z funkcjonowaniem komórki jak wzrost i proliferacja, w różnicowaniu i regeneracji tkanek, lecz także w procesie angiogenezy i rozwoju oraz przerzutowania nowotworów.

W przeciwieństwie do większości czynników wzrostu fibroblastów czynniki wzrostu fibroblastów 1 i 2, zwane także czynnikiem kwaśnym (FGF1) i zasadowym (FGF2) nie posiadają typowej sekwencji sekrecyjnej, jednak mogą być uwalniane lub wydzielane do środowiska zewnętrznego. FGF1 i FGF2 mogą wpływać na funkcjonowanie komórki poprzez wiązanie do powierzchniowych receptorów FGF (FGFR) i ich aktywację. Wykazano wiele bezpośrednich efektów działania FGF1 i FGF2 na komórkę i organizm, jednak ich biologiczna rola nie jest jeszcze do końca jasna.

Na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego zidentyfikowano szereg białek wewnątrzkomórkowych, oddziałujących z FGF1 i FGF2, biorących udział w proces apoptozy, jednocześnie wykazano, że FGF1 i FGF2 wykazują hamujący wpływ na proces programowanej śmierci komórki. Przedmiotem recenzowanej pracy są badania dotyczące wewnątrzkomórkowej aktywności antyapoptotycznej FGF1 i FGF2. Uzyskane wyniki mogą mieć istotne znaczenie praktyczne do wykorzystania terapeutycznego.

Rozprawa mgr Justyny Tomali ma układ typowy dla prac doktorskich, składa się ze streszczenia, wykazu skrótów, wstępu wprowadzającego w tematykę pracy, celu pracy, opisu wykorzystanych materiałów, części metodycznej, wyników, dyskusji oraz zestawienia cytowanej literatury.

Praca zawiera 131 stron maszynopisu, liczne rysunki, schematy, wykresy i tabele. Obszerny i czytelny wstęp pokrótce przedstawia najważniejsze informacje dotyczące ogólnego opisu rodziny czynników wzrostu fibroblastów, szczegółową charakterystykę czynników kwaśnego i zasadowego: FGF1 i FGF2, dane dotyczące receptorów czynnika wzrostu fibroblastów, opis szlaków sygnałowych aktywowanych przez białka należące do fibroblastycznych czynników wzrostowych, opis translokacji czynników wzrostowych w komórce, przybliżenie najważniejszych informacji związanych z programowaną śmiercią komórki wraz ze szczegółowym opisem poszczególnych szlaków aktywacji apoptozy. Przedstawiono także skrótowo informacje dotyczące białek partnerskich dla FGF1 i FGF2.

Cel pracy zostały jasno sformułowane, zasadniczym zadaniem było zbadanie wewnątrzkomórkowej roli FGF1 i FGF2 w apoptozie, z wykorzystaniem technik i czynników indukujących poszczególne szlaki aktywacji. Planowano także bliższe zbadanie oddziaływania FGF1 i FGF2 z poszczególnymi białkami partnerskimi, zaangażowanymi w proces apoptozy.

W części metodycznej przedstawiono szczegółowo wykorzystywane w pracy techniki preparatywne związane z ekspresją i oczyszczeniem białek, metody związane z doświadczeniami na hodowlach komórkowych: indukcję apoptozy, blokowanie szlaków jej przebiegu czy wyciszenie ekspresji białek za pomocą siRNA, a także instrumentalne techniki analityczne, jak spektroskopia fluorescencyjna, dichroizm kołowy, spektrometria mas czy cytometria przepływowa.

W części doświadczalnej zaprezentowano procedurę i wyniki otrzymywania oczyszczonych rekombinowanych białek FGF1 i FGF2 oraz szeregu wariantów mutacyjnych białka FGF2, mianowicie uprzednio otrzymanych 18 konstruktów zawierających pojedyncze, podwójne i potrójne mutacje w regionach o potencjalnym znaczeniu dla wiązania do FGF2 białek partnerskich, a także rekombinowanej proteazy TEV, wykorzystanej w dalszej części

eksperymentów do oddzielania metki GST (glutatio-S-transferazowej) od rekombinowanych białek oraz C-końcowej domeny nukleoliny, jądrowego białka partnerskiego, wykorzystywanej w późniejszych eksperymentach oddziaływania z czynnikami wzrostu.

Przeprowadzono analizę fizykochemiczną otrzymanych białek w celu potwierdzenia ich prawidłowej konformacji badając ich widma emisji fluorescencji oraz dichroizmu kołowego. Widma fluorescencji były charakterystyczne dla reszt tyrozyn, co przy jednoczesnym braku emisji charakterystycznego dla reszt tryptofanowych wskazywało na konformację wszystkich białek zbliżoną do natywnego FGF1 i FGF2. Także analiza białek metodą dichroizmu kołowego potwierdziła że mają one właściwą strukturę drugorzędową.

Porównawcza analiza oddziaływania otrzymanych białek natywnych oraz wariantów mutacyjnych z ośmioma białkami partnerskimi: PCAF, nukleoliną, Hsp90, CDK4, MDM2, p53, MYL9, oraz SIRT1 pozwoliła na ustalenie reszt aminokwasowych FGF2 zaangażowanych w największym stopniu w oddziaływanie z różnorodnymi białkami wewnątrzkomórkowymi, obszar ten pokrywa się częściowo z miejscem oddziaływania FGF2 z receptorem.

Analiza wpływu FGF1 i FGF2 na apoptozę prowadzona była poprzez szereg eksperymentów. Inhibicja aktywności receptora czynnika wzrostu FGFR gwarantowała obserwację w doświadczeniach wyłącznie wpływu czynników wzrostu importowanych do wnętrza komórki. Wyciszenie genów białek odpowiedzialnych za transport czynników wzrostu fibroblastów do jądra komórkowego: odpowiednio LRRC59 dla FGF1 i translokiny dla FGF2, potwierdziło, że import do jądra może być warunkiem antyapoptotycznych właściwości FGF1 i FGF2. Z kolei wyciszenie trzech białek partnerskich dla FGF2: nukleoliny, sirtuiny oraz nukleofosminy nie usunęło hamującego wpływu FGF 1 i 2 na proces apoptozy. Badania z wykorzystaniem wariantów mutacyjnych białek FGF1 i FGF2, wykazujących osłabione oddziaływanie z nukleoliną wskazują, że za zmniejszoną aktywność antyapoptotyczną FGF1 w stosunku do FGF2 może odpowiadać jego transport z jądra komórkowego po fosforylacji białka. Zastosowanie specyficznych inhibitorów kompetencyjnych dla blokowania poszczególnych szlaków aktywacji apoptozy wskazuje, że FGF1 i FGF2 hamują apoptozę na drodze szlaków zewnętrznego i wewnętrznego.

W szczegółowej dyskusji zwięźle podsumowano uzyskane wyniki i przedstawiono ich interpretację. W całej pracy Autorka cytuje 226 pozycji piśmiennictwa zarówno z ostatnich lat jak i wcześniejszych zebranych w części bibliograficznej, co świadczy o dogłębnej analizie dostępnej literatury tematu przez Doktorantkę.

Uwagi merytoryczne do przedstawionej pracy są nieliczne. W części związanej z analizą białek natywnych i ich wariantów metodą plazmonowego rezonansu powierzchniowego

analizowany jest tylko stopień względnej odpowiedzi sensora na podanie analitu (response units - RU). Ponieważ wielkość odpowiedzi sensora może wynikać z wielu czynników, interesujące byłoby w przyszłości przeanalizowanie uzyskanych sensogramów pod względem wartości współczynników powinowactwa dla poszczególnych par analitów, dane te pozwolą być może na precyzyjniejsze dane dotyczące siły wiązania poszczególnych wariantów mutacyjnych FGF2 do białek partnerskich. Czy dane dotyczące ilości użytej proteazy TEV (0,86 mg) są poprawne? Podana ilość proteazy wydaje się dość wysoka, w stosunku do ilości samego trawionego białka (10mg), dodatkowo w obrazie elektroforetycznym mieszaniny po trawieniu, przedstawionym na rys.2, można by spodziewać się także prążków pochodzących z samej proteazy, nawet założywszy jej autolityczne działanie. W części dotyczącej analizy poprawności konformacji uzyskiwanych białek osobom nie posiadającym wiedzy fachowej pomogłyby informacje i dyskusja dotyczące możliwości poprawnego fałdowania małego białka (FGF2 – 17,4 kDa) pomimo jego związania z dużą metką białkową GST (26 kDa).

Drobną uwagą dotyczącą konstrukcji pracy jest powtórzenie w rozdziale „Dyskusja” danych przedstawionych w poprzednich rozdziałach, i stanowiące w zasadzie w dużej części podsumowanie uzyskanych wyników. Podsumowanie takie dobrze ujmuje w skróconej formie zawartość rozdziału „Wyniki”, być może dla jasności pracy powinno być jednak wyodrębnione w dodatkowym rozdziale. Pewną słabością tego rozdziału jest dość ograniczone przedstawienie uzyskanych wyników na tle danych literaturowych. Powyższe uwagi te nie wpływają jednak na ogólną, pozytywną ocenę rozprawy.

W podsumowaniu należy podkreślić, że praca jest wartościowa, badania zostały prawidłowo zaplanowane i zrealizowane, zastosowana metodyka odpowiada założonemu celowi pracy a uzyskane wyniki są interesujące i dostarczają szeregu danych przybliżających wykorzystanie czynników wzrostu fibroblastów do zastosowań biomedycznych i terapeutycznych. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę są ciekawe, o dużym potencjale rozwojowym i praktycznym, dają także pole do następnych interesujących badań, na przykład zbadania zdolności uzyskanych wariantów mutacyjnych białek FGF2 do hamowania poszczególnych szlaków apoptozy.

Nie mam znaczących uwag krytycznych do pracy, błędy literowe oraz stylistyczne są nieliczne, tytuł jest zgodny z treścią rozprawy. Uzyskane wyniki zostały opisane szczegółowo i dobrze udokumentowane na wykresach i rycinach. Wysoko oceniam przedstawiony zakres merytoryczny pracy, który wymagał opanowania zarówno technik preparatyki białkowej, szeregu metod analizy instrumentalnej jak i metodyki hodowli komórkowych dla analizy poszczególnych szlaków apoptotycznych.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr Justyny Tomali 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 tym samym do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Justyny Tomali do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'J. Tomali', written in a cursive style.