



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryszycski

Przewodniczący Rady Naukowej  
Wydział Biotechnologii  
Uniwersytet Wroclawski  
ul. Fryderyka Joliot-Curie 14a  
50-383 Wroclaw

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Joanny Bober „Wewnątrzkomórkowe białka partnerskie czynnika wzrostu fibroblastów 1 (FGF1)”

Rozprawa doktorska mgr Joanny Bober „*Wewnątrzkomórkowe białka partnerskie czynnika wzrostu fibroblastów 1 (FGF1)*” jest monografią przedstawiającą opis wykorzystania wielu technik biochemii, biofizyki i biologii molekularnej do poszukiwań białek partnerskich ludzkiego FGF-1, a tym samym drogą dedukcji do określenia funkcji białka. Została przygotowana pod wspólnym kierunkiem prof. dr hab. Jacka Otlewskiego i dr hab. inż. Małgorzaty Zakrzewskiej w laboratoriach Zakładu Biotechnologii Białek Uniwersytetu Wroclawskiego, jak również w ramach współpracy z uczonymi z Institute for Cancer Research w Oslo.

Rozprawa została zgłoszona do obrony jako zestaw publikacji, z których dwie zostały opublikowane w dobrych czasopismach (IUBMB Life IF=2,65 i Plos One IF=3,54), a trzecia w postaci manuskryptu przygotowanego do wysłania. W pierwszej „*Identification of new FGF1 binding partners – implications for its intracellular function*” pani Bober jest pierwszą z 6-ciu, w drugiej - „*Nucleolin regulates phosphorylation and nuclear export of Fibroblast Growth Factor 1 (FGF1)*” trzecią wśród 10-ciu współautorów. W kolejnej - “*Translocated FGF1 and FGF2 protect the cell against apoptosis independently of FGF receptor activation*” drugą wśród siedmiu autorów. Faktyczny, bardzo znaczący, udział doktorantki jest opisany w ośmiostronicowym „*Streszczeniu publikacji*”, a także wynika z dołączonych na piśmie oświadczeń współautorów. Reprodukcje prac stanowią zasadniczy rdzeń rozprawy, ale zostały opatrzone krótkim pięciostronicowym *Wstępem*. Poza sekcjami poświęconymi dyskusji wyników, prezentowanych w trzech pracach, rozprawa zawiera dwu i pół - stronicową *Dyskusję* wraz z króciutko zarysowaną perspektywą dalszych badań.



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryszycski

Wobec sposobu prezentowania rozprawy trochę brakuje mi podrozdziału *Wnioski*, choćby w postaci punktów lub akapitów, w których wyartykułowano by zasadnicze osiągnięcia rozprawy.

Zapoznanie się z treścią całości wskazuje, że dwie opublikowane prace stanowią najważniejszą część rozprawy, które bez wątpliwości można potraktować jako zbiór tematycznie spójnych artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych, co wypełnia art. 13 pkt. 2 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami), zgodnie z którym „rozprawa doktorska może mieć formę (...) spójnego tematycznie zbioru publikacji opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopismach naukowych, określonych przez ministra właściwego do spraw nauki (...)”.

Z uwagi na udział pozostałych fragmentów, w tym trzeciej publikacji, uznałem, że ocenie powinienem poddać całą formę wydawniczą, będącą w istocie maszynopisem „książki”, której dwa najistotniejsze rozdziały stanowią reprinty publikacji.

Białka należące do rodziny FGF wykazują szerokie działanie mitogenne wobec wielu komórek oraz pośredniczą w kaskadach związanych z ich przeżywalnością, a także w rozmaitych procesach biologicznych, w tym w rozwoju embrionalnym, wzroście komórek, morfogenezie, naprawie tkanek, wzroście guzów oraz ich inwazji. FGF działa jako modyfikator migracji komórek i proliferacji, jak również jako czynnik angiogeny i apoptotyczny stąd waga tematyki badawczej nie podlega dyskusji.

We *Wstępie* Autorka wprowadziła czytelników w aktualny stan wiedzy dotyczący rodziny czynników wzrostu fibroblastów, a w szczególności ludzkiego FGF1, ich struktury, interakcji z białkami receptorowymi, szlakami sygnalizacyjnymi, w których uczestniczy m.in. FGF-1. Rozdział napisany jest jasno i przejrzysto. Doktorantka, zwróciła uwagę na nietypową drogę wydzielania FGF1 i FGF2, omijającą retikulum endoplazmatyczne i aparat Golgiego w związku z brakiem odpowiedniej sekwencji kierującej. Interakcja m.in. z białkami Syt1 i S100A13 umożliwia eksport FGF1 na zewnątrz komórki. Z kolei kluczem aktywacji wewnątrzkomórkowych kaskad sygnałowych są cztery receptory FGF z rodziny kinaz tyrozylowych. Czytelny schemat pokazuje transport FGF1 do wnętrza komórki na drodze endocytozy, translokację z endosomów do cytozolu i wreszcie do jądra komórkowego. Na koniec pada kluczowe pytanie o rolę FGF1 wewnątrz komórki i informacja o czterech dotychczas poznanych partnerach białkowych FGF1 (mortalina (in.GRP75/hthsp70/PBP74), FIBP, CK2 i LRRC59 (in. p34).



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

Ambitny cel pracy czytelnie sformułowano jako próbę zdefiniowania funkcji FGF1 na podstawie identyfikacji jak największej liczby białek o znanej aktywności, z którymi białko oddziałuje. Jako dodatkowe zadania postanowiono opisać interakcję FGF1- nukleolina i zweryfikować hipotezę o udziale FGF1 i FGF2 w procesie apoptozy, chociaż mam wrażenie, że ostatnie cele zostały sformułowane *post factum*, tym bardziej, że we wstępie nie uzasadniono wyboru nukleoliny, od której nb. zaczął się projekt biorac pod uwagę chronologię publikacji.

Celem pierwszej pracy była identyfikacja wewnątrzkomórkowych partnerów białkowych FGF1 i wstępna próba określenia roli białka. Podstawą wnioskowania były eksperymenty przy pomocy drożdżowego systemu dwuhybrydowego, techniki TAP i wreszcie dane z metody pull-down, dwie ostatnie w połączeniu z pomiarami masy cząsteczkowej powstających kompleksów. Weryfikację danych prowadzono przy pomocy metody Western blotting i SPR na rekombinowanych białkach. Autorka otrzymała homogenne, rekombinowane SBP-FGF1, GST-nukleofosfinę i GST-MVP (113-474). Nie do końca jest jasne, czy musiała opracować procedury preparacji czy korzystała z opisanych wcześniej protokołów. Następnie przeprowadziła eksperymenty TAP, transfekcję komórek HEK293, eksperymenty pull-down, pomiary SPR i część pomiarów postępu apoptozy. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów znaleziono 20 nowych białek partnerskich FGF1. W związku z powyższym, mam pytania: 1) czy Doktorantka ma teorię, dlaczego każda metoda wykrywa inne białka i w żadnym białko nie powtarza się? 2) czy którąkolwiek metodą wykryto kompleksy z białkami, o których wiadomo było wcześniej, że oddziałują z FGF1?

Co niezwykle interesujące połowa zarejestrowanych białek jest zaangażowana z żywotnością komórki, stąd logiczny wybór dalszych eksperymentów związany z analizą wpływu FGF1 na proces apoptozy w hodowli fibroblastów, które pokazały ewidentny ochronny wpływ białka wobec stresu komórkowego.

Druga publikacja opisuje biologiczną rolę interakcji nukleoliny, białka wcześniej nieźle opisanego w literaturze, z FGF1. Doktorantka otrzymała 17 mutantów FGF1 plus 3 warianty białka dzikiego opatrzonego etykietami -His, -SBP i -GST. Domyślam się, że pojawiały się kłopoty z rozpuszczalnością i oczyszczaniem niektórych wariantów, a następnie je scharakteryzowała metodami biofizycznymi. W dalszej kolejności przeprowadziła eksperymenty pull-down i pomiary kinetyczne techniką SPR. Recenzentowi dość trudno było rozdzielić wnioski płynące z całej publikacji związane rolę nukleoliny w fosforylacji i eksporcie FGF1 z jądra komórkowego od wniosków



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryszyci

płynących z eksperymentów Doktorantki. Tak czy inaczej wkład w ostateczny obraz pracy jest bardzo duży. Jedyne wątpliwości budzi we mnie komentarz na 16-tej stronie dotyczący wyznaczania  $K_D$  metodą SPR cyt. „*Mimo, że FGF1 występowało w postaci monomeru, krzywych asocjacji i dysocjacji nie udało się zanalizować w oparciu o model wiązania 1:1.*”. W pracy wprawdzie przedstawiono krzywe pierwotne, ale brak zależności sygnał=f(stężenie) co np. pokazałoby czy osiągnięto wysycenie i jaki przebieg ma krzywa wiązania. Nie jest dla mnie jasne dlaczego nie udało się dopasować krzywych do odpowiedniego modelu wiązania i jakie podejmowano próby. Metoda Svitela i wsp. wykorzystana przez Autorkę jest stosowana przy analizie heterogennych populacji w technice SPR i wypadałoby nieco bardziej szczegółowo odnieść się do interpretacji danych w kontekście np. stechiometrii, etapów wiązania, czy stanów konformacyjnych białek. Drobną uwagę techniczną dotyczącą Tab. S1. Podawanie danych liczbowych dotyczących stałych kinetycznych z dokładnością do 4-go miejsca po przecinku są wyraźną przesadą.

Manuskrypt trzeciej publikacji, napisanej wspólnie z p. Kostasiem, dotyczy roli FGF1 po wejściu do komórki w procesie jej apoptozy. Autorka przeprowadziła pomiary postępu apoptozy wywołanej różnymi czynnikami (brak surowicy, staurosporyna i. in) w wybranej linii komórkowej. W pracy oprócz FGF1 pojawia się również FGF2, który podobnie do FGF1 translokuje do wnętrza komórki. W pracy pokazano, że FGF1 i FGF2 dodane do fibroblastów w obecności inhibitorów kinazowej receptora FGF hamują apoptozę, natomiast wobec zahamowania procesu translokacji z endosomów do cytozolu działanie antyapoptotyczne zanika. Współudział Doktorantki w tej pracy jest jasno określony i istotny dla końcowych wniosków, chociaż nie tak duży, jak w przypadku pozostałych publikacji.

Podrozdział *Dyskusja* raczej podsumowuje wcześniej opisane wyniki i zwraca uwagę na konieczność dalszych badań dotyczących antyapoptotycznej funkcji FGF1 i FGF2 (warto by je skonkretyzować nie tylko w odniesieniu do p53). Bez wątpienia niezwykle interesujące wyniki wymagają choćby zweryfikowania roli wszystkich białek, również w eksperymentach *in vivo*, gdyż samo stwierdzenie że białka oddziałują jest jedynie przesłanką do dalszych eksperymentów.

Podsumowując, rozprawa doktorska pani mgr Joanny Bober zawiera bardzo duży materiał eksperymentalny, ma istotną wartość naukową i poznawczą. Doktorantce udało się zrealizować cele badawcze. Praca stanowi przykład efektywnego wykorzystania współpracy. Co ważne, badania wpisują się w tematykę doświadczeń zespołu promotorów



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryczycki

pracy, a jednocześnie stanowią świetny punkt wyjścia dla kolejnych badań. W pracy znalazłem wyjątkowo mało błędów literowych, co świadczy o starannej korekcie pracy.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Joanny Bober spełnia wymagania ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym, stanowi oryginalne rozwiązanie naukowe, wykazuje wiedzę teoretyczną Autorki i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia. W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wroclawskiego o dopuszczenie mgr Joannę Bober do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryczycki