

dr hab. Monika Słomińska-Wojewódzka, prof. UG
Katedra Biologii i Genetyki Medycznej
Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk

Gdańsk, 7.09.2023

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr Martyny Sochackiej

„Nowe funkcje białek homologicznych do czynników wzrostu fibroblastów”

Celem przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej była analiza nowych funkcji czynników homologicznych do czynników wzrostu fibroblastów (FHF). Badania obejmowały poznanie wewnątrzkomórkowej roli tych białek, ze szczególnym uwzględnieniem identyfikacji białek partnerskich przedstawiciela FHF, białka FGF12, a także weryfikację i charakterystykę wybranych oddziaływań międzybiałkowych. W pracy analizowano także możliwości oddziaływań między FHF a powierzchniowymi receptorami FGF (FGFR) oraz badano efekt biologiczny takich interakcji. Bardzo ciekawym aspektem pracy była także weryfikacja hipotezy zakładającej, że białka FHF mogą być wydzielane z komórek do przestrzeni międzykomórkowej. Praca została zrealizowana w Zakładzie Inżynierii Białka Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Zakrzewskiej, prof. UWr oraz dr. hab. Łukasza Opalińskiego, prof. UWr, pełniącego funkcję promotora pomocniczego.

Białka FHF tworzą grupę wewnątrzkomórkowych czynników wzrostu fibroblastów (FGF). Do podrodziny FHF zaliczane są cztery białka: FGF11, FGF12, FGF13 oraz FGF14. Jak dotąd, główna funkcja tych białek przypisywana była ich cytozolowej lokalizacji związanej z regulacją pracy kanałów jonowych błony plazmatycznej. Wiadomo także, że białka FHF oddziałują z białkami istotnymi w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, m.in. z IB2 (ang. *islet brain 2*), zwanym inaczej MAPK8IB2 (ang. *mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein*). Znaczenie tych oddziaływań nie zostało jednak w pełni określone. Białka FHF pełnią ważną rolę w regulacji pobudliwości neuronów oraz komórek mięśnia sercowego. Jednak, w przeciwieństwie do pozostałych białek FGF, ich funkcje w innych typach komórek nie zostały jeszcze dobrze

zbadane. Wiadomo jednakże, że FHF są białkami o działaniu plejotropowym, których deregulacja jest związana z zaburzeniami działania układu nerwowego, chorobami serca i nowotworami. Dokładne poznanie zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych funkcji białek FHF jest niezwykle istotne. Wybór tematyki badawczej rozprawy doktorskiej mgr Martyny Sochackiej jest zatem wysoce uzasadniony.

Przedstawiona do oceny praca doktorska stanowi zbiór spójnych tematycznie trzech prac eksperymentalnych opublikowanych w recenzowanych, prestiżowych czasopismach naukowych o łącznym IF= 20,914. W dwóch pracach opublikowanych w *Cell Communication and Signalling* Doktorantka jest pierwszą autorką, a w pracy opublikowanej w *FASEB Journal*, drugą. Prace są publikacjami wieloautorskimi, co jest uzasadnione, biorąc pod uwagę zakres prowadzonych prac eksperymentalnych i analizowanej problematyki badawczej. Z opisów, które znajdują się w przesłanych materiałach jednoznacznie wynika, że udział mgr Martyny Sochackiej w powstaniu prac, których jest pierwszą autorką miał charakter dominujący. Doktorantka pełniła kluczową rolę w realizacji opisywanych badań, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu rycin, a także uczestniczyła w pisaniu manuskryptów. W przypadku pracy opublikowanej w *FASEB J.*, mgr Martyna Sochacka wykonała istotną część prac eksperymentalnych, brała udział w analizie otrzymanych wyników, a także w przygotowaniu manuskryptu.

Zebrane publikacje zostały poprzedzone: streszczeniem napisanym w języku polskim i angielskim, wprowadzeniem, opisem celów pracy oraz listą publikacji wchodzących w skład przedstawionej rozprawy doktorskiej. We wprowadzeniu Doktorantka w sposób zwięzły i jasny opisuje rodzinę białek FGF, ze szczególnym uwzględnieniem budowy i funkcji białek FHF. Każda z publikacji została dodatkowo poprzedzona wstępem zawierającym opisy przeprowadzonych badań, otrzymanych wyników i najważniejszych wniosków. Załączone zostały także: podsumowanie, bibliografia, wykaz dorobku naukowego Doktorantki, a także lista projektów naukowych, których kierownikiem lub wykonawcą jest lub była mgr Sochacka. Jedyna uwaga techniczna dotycząca przygotowanego opracowania rozprawy doktorskiej to brak strony 7 trzeciej publikacji. Strona ta jednak znajduje się w opublikowanym, dostępnym w internecie artykule, zatem nie było problemu, aby zapoznać się z całością publikacji.

W pierwszej z przedstawionych do oceny prac, opublikowanej w 2022 roku (*Cell Commun. Signal.*), autorzy skupili się na określeniu partnerów białkowych oddziałujących z FGF12 - najlepiej poznanym przedstawicielem podrodziny FHF. Wśród ponad 70 białek, zidentyfikowano dużą grupę białek jądrowych, w szczególności wiążących RNA, które zaangażowane są w procesy translacji. Dwa niezwykle istotne białka należące do tej grupy to NOLC1 oraz TCOF1, biorące udział

w biogenezie rybosomów i odpowiedzi komórki na uszkodzenia DNA. W pracy wykazano, że największa pula wewnątrzkomórkowego FGF12 znajduje się w jądrze komórkowym, a dokładniej w jąderkach, w których występują także NOLC1 oraz TCOF1, a także inne białka zidentyfikowane za pomocą spektrometrii mas. Pozostałe białka FHF występują zarówno w cytoplazmie, jak i w jąderkach, jednak w różnych proporcjach. W pracy Doktorantka opisuje, że każde z białek FHF posiada co najmniej dwie izoformy: „a” zawierającą N-końcowy sygnał lokalizacji jądrowej (NLS, ang. *nuclear localization signal*) oraz „b” pozbawioną tego sygnału, lokalizującą głównie w cytoplazmie. W pracy wykorzystywano formę „b” FHF12. Wyniki tej pracy są zgodne z innymi badaniami, które wskazują na możliwość importu do jądra białek, które nie zawierają NLS. Takie białka nie oddziałują z receptorami transportowymi w sposób klasyczny, a są importowane do jądra oddziałując m.in. z białkami posiadającymi sekwencje NLS. **Czy na podstawie zidentyfikowanych białek oddziałujących z FHF12, można zakładać, że taki mechanizm transportu dotyczy formy „b” FHF12?** Inne ciekawe zagadnienie dotyczy różnej lokalizacji białek FHF. Doniesienia literaturowe opisują specyficzne sekwencje bogate w reszty argininy, które odpowiadają za lokalizację białek w jąderkach. **Czy taka sekwencja jest możliwa do identyfikacji w przypadku białek FHF12 i FHF13, które głównie lokalizują w jąderkach?** W pracy, której pierwszą autorką jest mgr Sochacka jednoznacznie wykazano, że FGF12 oddziałuje z NOLC1 i TCOF1, a tworzenie kompleksu tych białek jest zależne od fosforylacji tych ostatnich, szczególnie w przypadku oddziaływań FGF12 z NOLC1. W pracy wykazano także, że to C-terminalny rejon białka FGF12 odpowiada za oddziaływanie z NOLC1 i TCOF1. Co ciekawe, wszystkie białka FHF oddziałują z NOLC1, ale tylko FGF12 wiąże się z TCOF1. Biorąc pod uwagę, że wyciszenie ekspresji genu kodującego FGF12 skutkowało brakiem oddziaływań między NOLC1 i TCOF1 można zakładać, że FGF12 jest integralnym składnikiem kompleksu NOLC1/TCOF, biorącym udział w biogenezie rybosomów lub odpowiedzi komórki na uszkodzenia DNA.

Druga z cyklu prac, opublikowana w 2020 roku (*Cell Commun. Signal.*) wskazuje na możliwość aktywacji receptora FGFR przez FGF12 (FHF1). Wykazano jednoznacznie, że FGF12 oddziałuje z receptorami FGFR (FGFR1-4), powodując fosforylację FGFR oraz ERK1/2. Co istotne, aktywacja FGFR i zależnych od niego kaskad sygnałowych była wynikiem bezpośredniego oddziaływania z FGF12. Głównym efektem biologicznym związanym z aktywacją FGFR przez FGF12 jest odpowiedź antyapoptotyczna komórek. W przeciwieństwie do klasycznego czynnika FGF – FGF1, FGF12 nie wykazywał potencjału mitogennego i nie stymulował wychwyty glukozy. Brak tych aktywności, które są charakterystyczne dla kanonicznych białek FGF, wynika ze specyfiki działania FGF12, nie wiąże się natomiast z brakiem jego stabilności czy podatnością na degradację.

Należy podkreślić, że na potrzeby tych badań Doktorantka oczyściła rekombinowane białko FGF12 oraz dokonała jego wnikliwej analizy fizykochemicznej. W dyskusji publikacji wspomniano o badaniach dotyczących czynnika FHF2 (FGF13), który aktywował ścieżki sygnalizacyjne wpływając na proliferację komórek. **Bardzo proszę odnieść się do tych badań, w kontekście bardzo istotnych danych opisanych w tej rozprawie doktorskiej.**

W trzeciej z opublikowanych prac (2023, *FASEB J.*) pokazano po raz pierwszy, że wszystkie białka FHF są wydzielane z komórek do przestrzeni międzykomórkowej pomimo braku klasycznego sygnału do sekrecji. Dotyczy to zwłaszcza warunków stresu komórkowego, zaobserwowano efektywny transport FHF z komórek inkubowanych w temperaturze 42°C. Ilość białek FHF w przestrzeni międzykomórkowej zależy jednak od ich stabilności. W początkowych badaniach wykryto znikome ilości wydzielanego FGF11, co wiąże się z jego niską stabilnością i podatnością na degradację. Obecność heparyny znacząco zwiększyła ilość tego białka w przestrzeni międzykomórkowej. Sekrecja białek FHF odbywa się prawdopodobnie w sposób podobny do sekrecji czynnika FGF2. Transport ten jest niezależny od brefeldyny A, inhibitora transportu pęcherzykowego przez retikulum endoplazmatyczne i aparat Golgiego, zależy zaś od potencjału błonowego generowanego przez ATPazę Na(+)/K(+). Obecnie wiadomo, że wiele białek wydzielanych jest w sposób niekonwencjonalny (ang. UPS, *unconventional protein secretion*), a w sekrecji FGF2 z komórek pośredniczy szlak UPS typu I. **Proszę krótko omówić najbardziej istotne informacje dotyczące sekrecji FGF2. Czy można wnioskować, że transport białek FHF odbywa się z wykorzystaniem innego typu sekrecji UPS?** Sekrecja białek FHF ma prawdopodobnie bardzo istotne znaczenie w regulacji sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Wydzielane do przestrzeni międzykomórkowej FHF są aktywne biologicznie, stymulują szlak kinaz ERK1/2. Wykazano także, że rekombinowane białka FHF wiążą się do receptora FGFR1, ulegają internalizacji na drodze endocytozy zależnej od tego receptora, a aktywacja ścieżek sygnałowych przez białka FHF wynika z ich bezpośredniego oddziaływania z FGFR1. Podobnie jak w przypadku FGF12, pozostałe białka FHF wykazywały aktywność antyapoptotyczną, nie były natomiast zdolne do indukcji podziałów komórkowych i wychwyty glukozy w badanych liniach komórkowych.

Podsumowując, stwierdzam, że mgr Martyna Sochacka zrealizowała zakres badań będący celem dysertacji. Ogólna koncepcja pracy doktorskiej jest przemyślana, logiczna i bardzo spójna. Problem badawczy został poprawnie sformułowany. Praca zawiera oryginalne i wartościowe wyniki, które w bardzo istotny sposób poszerzają aktualny stan wiedzy dotyczący działania białek FHF. Eksperymenty przeprowadzono bardzo rzetelnie, prezentowane dane były weryfikowane z użyciem różnych układów eksperymentalnych, linii komórkowych lub technik

badawczych. Publikacje zawierają niezwykle starannie przygotowane figury. Otrzymane wyniki mogą stanowić podstawę do dalszych badań dotyczących m.in. szczegółowej charakterystyki białek FHF, ich mechanizmów sekrecji oraz analizy molekularnych podstaw chorób zależnych od tych białek.

Przedstawiona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Martynty Sochackiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto biorąc pod uwagę szeroki zakres prac badawczych, wartość naukową otrzymanych wyników, a także fakt, iż wszystkie zaprezentowane wyniki zostały opublikowane, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Martynty Sochackiej.

Monika Stymiralska-Wojewódzka