



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Kierownik Zakładu Immunologii

Prof. dr hab. Joanna Cichy

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Joanny Bober

pt. „Wewnątrzkomórkowe białka partnerskie czynnika wzrostu fibroblastów 1 (FGF1)”

wykonanej na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego,
pod kierunkiem

promotora: prof. dr hab. Jacka Otlewskiego

promotora pomocniczego: dr hab. inż. Małgorzaty Zakrzewskiej

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska dotyczy wewnątrzkomórkowej roli czynnika wzrostu fibroblastów typu 1 (FGF1) i w głównej mierze oparta jest na badaniu wewnątrzkomórkowych partnerów białkowych FGF1 za pomocą metod biochemicznych. Czynniki wzrostu z rodziny FGF, do których należy będący podstawowym przedmiotem rozprawy FGF1, a także FGF2, pełnią ważną rolę w regulacji wielu procesów komórkowych, takich jak; proliferacja, różnicowanie, żywotność komórek czy angiogeneza. Chociaż czynniki te są intensywnie badane od lat siedemdziesiątych, większość ich znanych funkcji zależy od aktywacji osadzonych w błonie komórkowej receptorów dla FGF, takich jak FGFR1, które to receptory posiadają wewnętrzną aktywność kinaz tyrozynowych. Związanie FGF1 do dimeru FGFR1 skutkuje uruchomieniem kaskady przekazu sygnału, który zależy od wzajemnej fosforylacji domen kinazowych w obrębie receptora. Wiadomo również, że FGF1 i FGF2 na drodze endocytozy dostają się do wnętrza komórek, skąd mogą przemieszczać się do cytozolu i jądra komórkowego. Co ciekawe, translokacja FGF do wnętrza komórki wydaje się nie zależeć od aktywności domeny kinazowej FGFR1. Lokalizacja FGF1 i FGF2 w cytozolu i jądrze komórkowym nasuwa pytanie o znaczenie wewnątrzkomórkowej puli tych czynników w procesach zależnych od FGF. Ponieważ jest to stosunkowo słabo przebadany problem, podjęcie tej tematyki przez Doktorantkę uważam za uzasadnione i ważne.

Rozprawę stanowi zbiór spójnych tematycznie trzech artykułów (dwóch opublikowanych i jednego przygotowanego do publikacji). W jednym z artykułów, opublikowanym w *IUBMB Life*, autorka jest pierwszym autorem. W pozostałych dwóch, odpowiednio trzecim (praca opublikowana w *PLOS One*) oraz drugim autorem (manuskrypt). Ponadto, rozprawa doktorska jest opatrzona streszczeniem głównym w j. polskim i angielskim, a także kilkunastostronicowym, napisanym po polsku wprowadzeniem, na który składa się; wstęp, cel badań, streszczenia wszystkich trzech publikacji oraz dyskusja. Ważną częścią tego wprowadzenia jest jasny opis wkładu Doktorantki w badania, który wskazuje na Jej wielostronne zaangażowanie w pracę doświadczalną i interpretacyjną, przede

wszystkim w produkcję rekombinowanych białek oraz ich mutein, a także analizę oddziaływań pomiędzy białkami czy pomiary apoptozy komórek.

Wprowadzenie jest napisane w sposób przejrzysty, chociaż dość lakoniczny. Z całą pewnością ta część rozprawy byłaby bardziej interesująca, gdyby zawierała mniej literalnych powtórzeń informacji zawartych w załączonych artykułach, lub streszczeniu głównym. Z obowiązku recenzenta wymieniam drobne uchybienia w terminologii, np. „organizmy niskie takie jak *Caenorhabditis elegans...*”, (str. 8) zamiast organizmy niskie ewolucyjnie, i uchybienia edytorskie, np. „na co sugerowały wyniki eksperymentów” (str. 22) zamiast „co sugerowały wyniki eksperymentów”.

Niewielkie zastrzeżenia budzi też oryginalność rycin zamieszczonych w tej części rozprawy. Dla przykładu, Rysunek 2 wydaje się być własnoręcznie przygotowany przez Doktorantkę, ale nie jest jasne czy wg. Jej autorskiej koncepcji. Brak odniesień literaturowych pod rysunkiem, utrudnia ocenę oryginalności tej ryciny, chociaż jej zamieszczenie w tej części rozprawy ułatwia czytelnikowi śledzenie treści.

W pierwszej publikacji (IUBMB Life, 2016), w której Doktorantka jest pierwszym autorem, wykonano badania, których celem była identyfikacja wewnątrzkomórkowych partnerów białkowych FGF1 i w ten pośredni sposób próba znalezienia funkcjonalnego znaczenia obecności FGF1 wewnątrz komórek. Godne uwagi jest zastosowanie trzech niezależnych podejść eksperymentalnych w celu identyfikacji białek partnerskich FGF1; drożdżowego systemu dwuhybrydowego, oraz dwóch metod opartych na spektrometrii mas (MS). Podczas gdy w pierwszej metodzie MS identyfikowano białka związane do FGF1, w komórkach stabilnie transfekowanych za pomocą odpowiednio zmodyfikowanych wektorów ekspresyjnych kodujących FGF1 (posługując się tzw. techniką oczyszczania TAP (Tandem Affinity Purification), w drugiej identyfikowano białka partnerskie obecne w lizatach komórkowych i wiążące się do immobilizowanego, rekombinowanego białka FGF1. Łączne użycie tych metod badawczych doprowadziło do identyfikacji potencjalnych 20 wewnątrzkomórkowych białek partnerskich FGF1, z których połowa jest związana z procesami kontrolującymi żywotność komórek. Funkcja tych białek partnerskich sugerowała zaangażowanie wewnątrzkomórkowego FGF1 w regulację apoptozy, co wstępnie zweryfikowano w publikacji 1 i rozwinięto w publikacji 3.

Mimo tego, że w pełni doceniam dogłębną analizę biochemiczną zaprezentowaną w tej publikacji, jej lektura nasunęła mi kilka wątpliwości.

Dlaczego podczas weryfikacji białek partnerskich metodą co-precypitacji, w żadnym z doświadczeń nie zastosowano innych rekombinowanych białek, równoległe do FGF1, jako kontroli negatywnej? Użycie dużej ilości dowolnego białka rekombinowanego, z dużym prawdopodobieństwem spowoduje „wyłowienie” z lizatów komórkowych wielu białek. Dlatego, użycie innego białka rekombinowanego, uwiarygodniłoby specyficzność oddziaływań pomiędzy FGF1 i zidentyfikowanymi w rozprawie białkowymi partnerami FGF1.

Dodatkowym argumentem przemawiającym za specyficznym wiązaniem się zidentyfikowanych białek do FGF1, mogłoby być użycie natywnego białka FGF1 i co-precypitacja natywnego kompleksu białek, a następnie detekcja związanych białek partnerskich; i odwrotnie, detekcja natywnego FGF1 po co-precypitacji kompleksu przy użyciu przeciwciał dla postulowanego partnera białkowego FGF1.

Szkoda również, że praca nie obrazuje oddziaływań pomiędzy FGF1 i zidentyfikowanymi białkami partnerskimi wewnątrz komórek np. za pomocą immunofluorescencji.

Na rycinie 5, w której pokazano względną aktywność kaspazy 3/7 w komórkach traktowanych FGF1 w obecności inhibitora FGFR-PD173074, brak informacji jak na komórki zadziałał sam inhibitor.

Wszystkie trzy metody identyfikacji białek partnerskich FGF1 doprowadziły do znalezienia innych partnerów FGF1. Chociaż Doktorantka zwraca na to uwagę, w żaden sposób nie komentuje tego wyniku.

W publikacji 2 (PLOS One, 2014), głównym przedmiotem analizy jest oddziaływanie pomiędzy FGF1 i wielofunkcyjnym białkiem jądrowym, nukleoliną. W serii logicznie zaplanowanych eksperymentów, autorzy najpierw identyfikują nukleolinę jako wewnątrzkomórkowe białko partnerskie FGF1 (podobnie jak w publikacji 1), a następnie konstruują muteiny FGF1. Użycie zmutowanych wariantów FGF1, do oczyszczania i analizy których przyczyniła się głównie Doktorantka, umożliwiło zdefiniowanie reszt aminokwasowych kluczowych dla oddziaływań pomiędzy FGF1 i nukleoliną. Posiadanie takiego narzędzia badawczego było także istotne dla pokazania znaczenia oddziaływań pomiędzy FGF1 i nukleoliną, a mianowicie do wykazania, że interakcja między tymi białkami sprzyja fosforylacji FGF1 przez kinazę PKC δ co umożliwi eksport FGF1 z jądra do cytozolu, gdzie FGF1 ulega degradacji. Ta praca zasługuje na szczególną uwagę, ponieważ dobrze ilustruje główny zamysł niniejszej rozprawy. Tak jak postulowano, identyfikacja białka partnerskiego dla FGF1 o znanej funkcji, doprowadziła w serii dodatkowych analiz do znalezienia biologicznego znaczenia tych oddziaływań.

W publikacji 3 (manuskrypt), postawiono pytanie o znaczenie wewnątrzkomórkowej puli FGF1 w procesie apoptozy. Uzasadniały to w pełni wyniki opisane w publikacji 1, w której połowa wewnątrzkomórkowych białek partnerskich FGF1 jest znana z regulacji żywotności komórek. Aby wyeliminować kaskadę sygnału zainicjowaną przez wiązanie FGF1 lub FGF2 do receptora FGF i fosforylację domen kinazowych FGFR, aktywność kinazową FGFR zablokowano farmakologicznie, poprzez użycie odpowiednich inhibitorów. Alternatywny model badawczy opierał się na wykorzystaniu komórek z wprowadzonym receptorem FGFR1 pozbawionym aktywności kinazowej. Wykazano, że kinazowa aktywność tyrozynowa FGFR nie jest konieczna do antyapoptotycznego efektu FGF1 i FGF2. Ze względu na zahamowanie aktywności antyapoptotycznej FGF1 przez kilka inhibitorów celujących w białka konieczne do translokacji FGF1 z endosomów do cytozolu/jądra komórkowego, wyniki te wskazują na prawdopodobny udział wewnątrzkomórkowych czynników FGF w kontrolę procesu apoptozy.

Generalnie manuskrypt prezentuje solidne wyniki, które wydają się potwierdzać tezę o antyapoptotycznym działaniu wewnątrzkomórkowej puli FGF1 i FGF2. Mam jednak kilka uwag i sugestii.

Nie jest dla mnie jasne jak sama heparyna, używana we wszystkich eksperymentach łącznie z FGF wpływa na regulację apoptozy?

Praca zyskałaby, gdyby pokazano oryginalne wyniki cytometryczne (przykładowe ploty z FACS), a nie tylko ich opracowaną formę w postaci wykresów słupkowych. Jest to o tyle istotne, że stopień apoptozy w komórkach pozbawionych surowicy i hodowanych w obecności inhibitorów FGFR wydaje się bardzo duży.

Brak jednoznacznego porównania antyapoptotycznego działania FGF1 i FGF2 w komórkach z zablokowaną aktywnością FGFR i z normalnie funkcjonującym receptorem.

We wszystkich eksperymentach bazujących na frakcjonowaniu struktur komórkowych (np. Rys 4) nie znalazłam kontroli czystości frakcji.

Użycie komórek U2OS, które posiadają endogenne receptory FGF (str. 12), do badania wpływu zmodyfikowanych genetycznie receptorów FGF, nie wydaje się do końca przekonujące. Bardziej zasadne byłoby wykorzystanie komórek, które nie mają FGFR1 i FGFR4.

Podoba mi się, że w pracy wykonano kontrolę aktywności receptora w komórkach NIH3T3 hodowanych bez surowicy (w celu indukcji apoptozy) i w obecności inhibitorów FGFR (Fig. 1S). Nie znalazłam jednak takich kontroli dla innych układów eksperymentalnych (tj. innych komórek, lub innych sposobów indukcji apoptozy, np. za pomocą staurosporyny).

W podsumowaniu, przedstawione w rozprawie wyniki badań oceniam bardzo pozytywnie, do czego przyczynia się bardzo solidny, rozbudowany i dobrze dobrany warsztat biochemiczny, a także szeroko-zakrojone, przesiewowe podejście do zrozumienia funkcji FGFR1 poprzez identyfikację wielu białek partnerskich FGF1. Niniejsza dysertacja stanowi bardzo dobry punkt wyjścia do dalszych badań funkcji FGF1 w oparciu o nowo-scharakteryzowane, białka partnerskie.

Przedstawiona do oceny dysertacja spełnia wymogi określone w Rozporządzeniu Rady Ministrów z dnia 8. 10. 1991r. w sprawie warunków i trybu przeprowadzenia przewodów doktorskich i habilitacyjnych (Dz. U. nr 92, poz. 410 z późn. zm.) i odpowiada warunkom Ustawy z dnia 18. 03. 2011r. o stopniach naukowych i tytułach naukowych. Ponadto, dorobek naukowy Doktorantki uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia. Zgłaszam zatem formalny wniosek do Rady Naukowej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani Joanny Bober do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. Joanna Cichy

