



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Zakład Biochemii Analitycznej

Kierownik

Prof. dr hab. Adam Dubin

R E C E N Z J A

rozprawy doktorskiej Pana mgr Michała Kostasia

Tytuł rozprawy: Udział fibroblastycznych czynników wzrostu 1 i 2 (FGF-1 i FGF-2) w procesie apoptozy

Zainteresowanie fibroblastycznymi czynnikami wzrostu ze zrozumiałych powodów nie słabnie od czasu ich wyizolowania przez Gospodarowicza w 1975 roku. Według Web of Science ilość prac zawierających w tytule te trzy słowa sięga ponad 14 000 a w ostatnich 5 latach publikowalność w tym zakresie ustabilizowała się na poziomie ok. 1 000 prac rocznie. W skład rodziny fibroblastycznych czynników wzrostu wchodzi 22 białka kręgowców z których czynniki 1-10 wiążą się do specyficznych, komórkowych, transbłonowych receptorów czynników wzrostowych FGFR (1-4), posiadających zewnątrzkomórkowe domeny podobne do immunoglobulin i wewnątrzkomórkowe o aktywności kinazy tyrozynowej. Wiązanie FGF-1 czy FGF-2 do receptorów powoduje ich autofosforylację która prowadzi do aktywacji wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych zaangażowanych w rozliczne procesy komórkowe takie jak proliferacja, migracja, angiogeneza czy rozwój zarodkowy.

Grupa badawcza prof. Jacka Otlewskiego i dr hab. Daniela Krowarscha zajmuje się od kilku lat między innymi funkcją i stabilnością fibroblastycznych czynników wzrostu 1 i 2 w aspekcie badania mechanizmu wiązania do receptorów i interakcji z białkami partnerskimi zaangażowanymi w proces apoptozy oraz możliwościami ich zastosowania w terapii nowotworowej. Tak więc temat rozprawy doktorskiej jest dobrze umocowany w dotychczasowej działalności badawczej promotora i doświadczeniu Zakładów Inżynierii Białek i Biotechnologii Białek Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego.

Ogólna charakterystyka pracy

Ocenianą rozprawę przygotowano w języku polskim w tradycyjnym układzie tekstu i zilustrowano 22 rysunkami oraz udokumentowano 333 pozycjami cytowanej literatury, z których niemal połowę opublikowano po roku 2000.

Autor w 25 stronicowym wprowadzeniu omawia krótko fibroblastyczne czynniki wzrostu i ich specyficzne receptory ze szczególnym naciskiem na ich rolę w aktywacji wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych, ich translokacji do cytozolu i jądra komórkowego oraz charakteryzuje możliwe białka partnerskie zaangażowane w procesie apoptozy.

W moim odczuciu ta część pracy, pomimo swojej niezbyt rozbudowanej formy, wystarczająco wprowadza czytelnika w omawiany temat, jest nie tylko szczegółowo przemyślana ale i przystępnie napisana poprawnym językiem.

Metody opisano na 19 stronach. Wynika z nich, że autor posłużył się standardowymi procedurami biologii molekularnej w celu uzyskania białek rekombinowanych w heterologicznym systemie bakteryjnym i oczyścił do homogenności w SDS-PAGE hormony wzrostu 1 i 2, nukleofosminę oraz białkowy inhibitor apoptozy 5 metodami chromatografii powinowactwa i chromatografii jonowymiennej. Z innych używanych przez autora metod należy wymienić biotynylację białek, pomiary widm fluorescencji i dichroizmu kołowego, badanie oddziaływań białko-białko techniką *pulldown* czy też z użyciem powierzchniowego rezonansu plazmowego.

Uzyskane wyniki opisane na 32 stronach są bardzo dobrze opracowane i udokumentowane 22 przejrzystymi rysunkami. Cała robiąca dobre wrażenie rozprawa doktorska jest zakończona 10 stronicową dyskusją z wnikliwym podsumowaniem.

Cel pracy, stan wiedzy oraz kompetencje autora

Wiedza zawarta we wstępie wprowadza w jasno sformułowany cel pracy którym jest próba wyjaśnienia roli translokacji czynników wzrostu FGF-1 i FGF-2 przez błonę endosomalną do cytozolu i jądra komórkowego. Zaplanowane badania powinny dostarczyć ewentualnego potwierdzenia hipotezy, że białka te mogą pełnić funkcję antyapoptotyczną w warunkach stresowych poprzez oddziaływanie z potencjalnymi, wcześniej wskazanymi wewnątrzkomórkowymi białkami partnerskimi.

Egzogenne FGF-1 czy FGF-2 poza aktywacją wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych związaną z wiązaniem do receptorów mogą być też importowane do cytozolu i jądra komórkowego i wraz z pulą endogennych form mogą spełniać rozliczne funkcje patofizjologiczne takie jak proliferacja fibroblastów, astrocytów czy kardiomiocytów oraz wywierać wpływ na oporność komórek rakowych na promieniowanie jonizujące czy chemioterapię poprzez zahamowanie procesów apoptozy. Wykazano, że translokacja nie jest procesem konstytutywnym lecz zachodzi w warunkach stresowych

ale pełna rola czynników wzrostowych w cytozolu oraz jądrze komórkowym jest nadal nieznana więc realizacja postawionego w rozprawie celu jest nadwyraz wskazana.

Mgr Michał Kostaś ma w swoim dotychczasowym dorobku dwie oryginalne prace współautorskie opublikowane w 2014 roku a dotyczące opracowania odpornych na proteolizę wariantów FGF-1 (Kobiela i wsp., Protein Pept. Lett.) oraz charakterystyki oddziaływania wraz z określeniem funkcji jądrowego białka nukleoliny w regulacji fosforylacji i jądrowego eksportu FGF-1 (Sletten i wsp., PLOS One). Doktorant uczestniczył też wcześniej w badaniach, które doprowadziły do zidentyfikowania szeregu wewnątrzkomórkowych białek partnerskich mogących oddziaływać z FGF-1 i FGF-2 a zaangażowanych w procesie apoptozy takich jak: komórkowy antygen nowotworowy - p53, ligaza E3 ubikwityny - MDM2, deacylaza białkowa - situina 1, autoantygen błony naczyniowej - UACA podjednostka katalityczna acetylotransferazy histonów - PCAF, czy kinaza 4 zależna od cyklin – CDK4. Z krótkiej informacji zawartej w podziękowaniach oraz przestudiowaniu opisu użytych materiałów można wywnioskować o wykonaniu części eksperymentów we współpracy z prof. Antonim Więdołcha z Zakładu Biochemii Uniwersytetu Oslo od którego otrzymano między innymi: wektory z wstawkami zawierającymi sekwencje kodujące FGF-1 (Met-Ala-FGF1²¹⁻¹⁵⁴), FGF-2 (FGF2¹⁻¹⁵⁴) oraz wariant mutacyjny białka FGF-1 (S130A). Wektor z wstawką FGF-1 (Q40P/S47I/H93G udostępniła Pani dr Małgorzata Zakrzewska.

Wyniki

Białka FGF-1 (fragment 21-151), SBP-FGF-1 białko fuzyjne ze metką wiążącą streptowidyną, FGF-2 (1-154) oraz ich warianty mutacyjne nadprodukowano w *E. coli* i oczyszczano do formy homogennej testowanej w SDS-PAGE. Podjęto próbę pojedynczego podstawiania biotyną na resztach aminowych białek FGF-1 i FGF-2 ale udało się w jedynie w przypadku FGF-2. W związku z tym do dalszych badań użyto białka fuzyjnego FGF-1 zawierającego metkę peptydową wiążącą streptowidynę (SBP-FGF-1). Sprawdzono poprawność zwinięcia obu znakowanych białek poprzez pomiary widm dichroizmu kołowego oraz wygaszania fluorescencji reszty tryptofanu w warunkach natywnych i po denaturacji. Zastosowanie metody wygaszania fluorescencji do poprawności zwinięcia białka fuzyjnego SBP-FGF-1 nie było możliwe z uwagi na fakt, że we fragmencie peptydowym wiążącym resztę streptowidyny wprowadzono dodatkową resztę tryptofanu.

Wykazano bezpośrednie oddziaływanie białek SBP-FGF-1 i biot-FGF-2 ze zidentyfikowanymi wcześniej wewnątrzkomórkowymi białkami wiążącymi biorącymi udział w procesie apoptozy takimi jak: p53 (komórkowy antygen nowotworowy), MDM2 (ligaza E3 ubikwityny), Sirt1 (sirtuina 1, deacetylaza białkowa), UACA (autoantygen błony naczyniowej) PCAF (podjednostka katalityczna acetylotransferazy histonów) oraz CDK4 (kinaza 4 zależna od cyklin). Nie potwierdzono wiązania do SBO-FGF-1 MDM2 oraz wykazano jedynie słabe wiązanie p53. Przeprowadzono wstępne pomiary kinetyczne oddziaływań badanych białek przy pomocy techniki powierzchniowego rezonansu plazmowego. Uzyskane równowagowe stałe dysocjacji rzędu 20-84 nM wskazują na dość silne oddziaływanie FGF-1 i FGF-2 z badanymi białkami. Przeprowadzono szereg udanych eksperymentów potwierdzających wpływ fibroblastycznych czynników wzrostowych (egzo- i endogennych) na proces apoptozy wywołany czynnikiem stresowym. Przebadano efekt aktywatorów białka p53 z zastosowaniem specyficznych inhibitorów aktywności kinazowej FGFR blokujących wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe oraz wpływ mutacji w białku FGF-1 na zablokowanie translokacji tego białka do cytozolu i jądra komórkowego. Wykazano efekt Inhibitorów HSP90 oraz inhibitora kinazy p38 na antyapoptotyczną aktywność fibroblastycznych czynników wzrostu.

Wszystkie przeprowadzone eksperymenty są dobrze opisane i przedstawione w logicznej kolejności, a zaprezentowane wyniki są dobrze umotywowane i zinterpretowane dając możliwość przeprowadzenia klarownej i rzeczowej dyskusji i wyciągnięcia nie budzących zastrzeżeń rzetelnych wniosków końcowych.

Ogólne odczucie i ewentualne pytania

Rozprawa doktorska mgr Michała Kostasia to opracowanie będące przykładem wzorowej krytycznej oceny wyników uzyskanych przy pomocy wysokiej klasy warsztatu badawczego i dlatego zasługuje na wyróżnienie. Praca jest napisana przejrzyście, bardzo dobrym językiem i właściwie, nie mam zasadniczych uwag krytycznych co do strony merytorycznej jak i redakcyjnej. Nie znalazłem w rozprawie niezgrabności językowych czy też niepoprawnych sformułowań też jest godne zaznaczenia. Widać, że praca została nie tylko wzorowo zaplanowana, ale przede wszystkim dobrze przemyślana i wielokrotnie sprawdzona redakcyjnie co zasługuje na szczególne wyróżnienie.

Lektura rozprawy doktorskiej nasuwa też następujące pytania do dyskusji.

1. Wiadomo, że ludzki FGF-1 w porównaniu do FGF-2 jest słabiej rozpuszczalny, ma niższą temperaturę denaturacji i relatywnie krótszy czas życia *in vivo* w związku z podatnością na proteolizę i dlatego dla jego „ulepszenia” zastosowano z powodzeniem metody inżynierii białka w zespole prof. Jacka Otlewskiego (Zakrzewska i wsp., *J.Biol.Chem.*, 2009; Slettern i wsp., *PLOS One*, 2014). Większość eksperymentów przeprowadzonych w pracy wymagała jednak użycia hormonu niemodyfikowanego i napotkano na pewne trudności eksperymentalnych takich jak np. niemożność wydajnego uzyskania, pojedynczo znakowanych biotyną cząsteczek FGF-1. W konsekwencji zastosowano białko fuzyjne z metką wiążącą streptowidyną, co uniemożliwiło ze względu na obecność reszty tryptofanu w zastosowanej metce, oznaczenia poprawności zwinięcia tego białka fuzyjnego poprzez pomiary fluorescencji i dodatkowo utrudniło porównanie oddziaływań z zastosowaniem obu różnie wyznakowanych hormonów. Nasuwa się pytanie czy te kłopoty znakowania w przypadku FGF-1 związane są z niestabilnością białka czy raczej spowodowane są jego charakterem. Oba hormony różnią się bowiem składem aminokwasowym, głównie w zakresie aminokwasowych reszt naładowanych. FGF-1 jest nazywany kwasowym ponieważ zawiera w sekwencji 28-151 o 9 ładunków dodatnich mniej od FGF-2 (4 reszty lizyny mniej i 5 reszt kwasu glutaminowego i asparaginowego więcej) .

2. czy określano jaki był poziom endogennych FGF-1 i FGF-2 w trakcie eksperymentów (też w transferowanych komórkach) w porównaniu do poziomu egzogennych hormonów i jaki procent egzogennych hormonów był translokowany do cytozolu i jądra?

Drobne uwagi krytyczne i niedociągnięcia:

- w całej pracy zastosowany mylne oznakowanie mutacji punktowych we wstawce FGF-1^{Q40P/S47I/H93G} zamiast poprawnego FGF-1^{Q40P/S47I/H93G}
- czy rzeczywiście próbki do SDS-PAGE inkubowano w 99°C przez 15 min a jeżeli tak to jaki był cel tak długiej preinkubacji
- nie widzę uzasadnienia użycie na str. 46 nazwy bufor lizujący (str. 43)
- jakie inhibitory proteaz zastosowano w tzw. buforze lizującym?

Wskazane wydawałoby się wprowadzenie w rozprawach doktorskich zwyczaju zamieszczania dotychczasowego dorobku publikacyjnego doktoranta z zaznaczeniem prac z zakresu tematu rozprawy. Taka informacja klarowałaby obraz dokonań doktoranta oraz ustrzegłaby przed ewentualnymi niesprawiedliwymi zarzutami recenzentów i czytelników.

Podsumowanie oceny

Rozprawę doktorską Pana mgr Michała Kostasia oceniam bardzo wysoko tak pod względem merytorycznym jak i redakcyjnym. Podziwiam klarowność wywodów, wielość stosowanych technik, dokładność opisów wykonanych eksperymentów, skrupulatność oraz konsekwentność w realizacji postawionych zadań i wreszcie formę oraz rzetelność przedstawienia wyników jak i ostrożność w wyciąganiu wniosków i rzeczową krytyczną dyskusję.

Stwierdzam, że przedłożona rozprawa doktorska spełnia wszystkie warunki przewidziane Ustawą z dnia 18 marca 2011 r. o stopniach naukowych i tytułach naukowych oraz tradycją dla prac doktorskich a dorobek kandydata uzasadnia nadaniu stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia.

Wnioskuje do Rady Naukowej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pana mgr Michała Kostasia do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

W moim odczuciu przedstawiona rozprawa doktorska, jej innowacyjność oraz fakt, że można ją uznać jako zdecydowanie ponad przeciętną zasługuje na wyróżnienie. Dlatego z pełnym przekonaniem zwracam się do Rady Naukowej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego z takim wnioskiem.

Prof. dr hab. Adam Dubin