

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Kajstury pt.

„Effects of Geldanamycin, a Ligand of Heat Shock Protein 90, on Cell Cycle Progression and Induction of Apoptosis in Human Lymphocytes and Jurkat Cells”

Rozprawa doktorska mgr M. Kajstury poświęcona jest próbie wyjaśnienia wewnątrzkomórkowych mechanizmów wpływu geldanamycyny (GELD) na przebieg cyklu komórkowego oraz indukcję apoptozy w ludzkich limfocytach oraz w modelowych komórkach limfoidalnych linii Jurkat. Geldanamycyna, benzochinonowy antybiotyk, stała się obiektem szerokiego zainteresowania badaczy po tym, jak stwierdzono, że jest ona specyficznym ligandem oraz silnym inhibitorem białka szoku cieplnego, Hsp90. GELD oraz jej syntetyczne analogi są już wykorzystywane w terapii niektórych nowotworów człowieka, przy czym wewnątrzkomórkowe procesy odpowiedzialne za aktywność przeciwnowotworową są tylko częściowo poznane. Z tego względu temat pracy jest oryginalny i jednocześnie bardzo istotny z klinicznego punktu widzenia.

Dla zrealizowania tych zadań Doktorantka posłużyła się metodami właściwymi dla badań hodowli prawidłowych i nowotworowych ludzkich linii komórkowych, głównie techniką cytometrii przepływową. Podjęty temat jest naturalną kontynuacją wieloletniej współpracy Profesora Zbigniewa Darzynkiewicza z Brander Cancer Research Institute, New York Medical College, Valhalla, USA, z Profesorem Jerzym Dobruckim, kierownikiem Zakładu Biofizyki Komórki na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, Promotorem omawianej rozprawy.

Rozprawę przygotowano w klasycznej formie, w której po „Wstępie” następuje opis materiałów i zastosowanych metod, a następnie przedstawienie wyników i ich omówienie w postaci dyskusji i wniosków. Praca liczy 75 stron ciasno napisanego tekstu, zawiera 32 ryciny obrazujące struktury badanych związków, schematu i wyniki analiz, w tym wykresy z cytometru przepływowego oraz około 210 pozycji piśmiennictwa. Dysertacja napisana jest w całości w języku angielski, co jest zrozumiałe wzięwszy pod uwagę przebieg pracy naukowej Doktorantki. Rozprawę uzupełniają streszczenie oraz wykaz skrótów.

Rozdział wstępny uważam za ważną część rozprawy, ponieważ zawarte w nim informacje dokumentują zarówno bardzo dobrą orientację Autorki w zagadnieniach będących przedmiotem rozprawy oraz prowadzą do przedstawienia celu podjętych badań.

W 8 podrozdziałach „Wstępu” Doktorantka przedstawiła najpierw strukturę i syntezę geldanamycyny oraz podstawowe informacje o białku szoku termicznego Hsp90. Mgr M. Kajstura podkreśla konserwatywny charakter Hsp90 oraz fakt, iż stanowi ono znaczną część wszystkich białek komórek Eukaryota (1-2% w stanie normalnym i 4-6% w stanie stresu komórkowego). Hsp90 uczestniczy w bardzo wielu procesach komórkowych, typowych dla innych białek z rodziny Hsp, będąc białkiem chaperonowym dla stale rosnącej liczby (obecnie ponad 700) strukturalnych, enzymatycznych i regulatorowych białek komórki. Następnie Autorka omawia trójwymiarową strukturę homodimeru Hsp90 w stanie nieaktywnym oraz zasadniczą zmianę konformacji GELD po związaniu ATP, a następnie po hydrolizie tego nukleotydu, co odgrywa zasadniczą rolę w aktywacji i stabilizacji białek wiążących się z Hsp90. Kluczowy mechanizm interakcji Hsp90 z GELD polega na wiązaniu się GELD w miejscu wiążącym cząsteczkę ATP, co zasadniczo wpływa na funkcje chaperonowe Hsp90.

W kolejnych podrozdziałach przedstawiono rolę HSP90 w cyklu komórkowym wskazując na szeroki profil białek, które mogą być „klientami” tego chaperonu, włączając w to białka istotne dla inicjacji i progresji niektórych nowotworów, m.in. receptory estrogenowe i androgenowe, białka p53 i HIF-1 α , a także katalityczną podjednostkę telomerazy. Uzasadnienie dla podjęcia badań jest konstatacja, powzięta w oparciu o dane literaturowe, wskazująca na to, że mimo wielu prób klinicznych zastosowania GELD i jej analogów w terapii przeciwnowotworowej, jak dotąd uzyskano zaskakująco mało danych dotyczących wpływu GELD na cykl komórkowy i śmierć komórki, przy czym to ostatnie zagadnienie pozostaje właściwie niewyjaśnione.

Dane zawarte w końcowej części „Wstępu” wskazują na to, że zahamowanie aktywności białka HSP90 prowadzi do apoptozy *in vitro*, przy czym mechanizm tego procesu związany jest z oddziaływaniami między Hsp90 a czynnikiem transkrypcyjnym NF- κ B. W warunkach prawidłowych NF- κ B hamuje apoptozę poprzez indukowanie transkrypcji genów kodujących białka o funkcjach antyapoptotycznych i antyoksydacyjnych. Ta aktywność NF κ B zależna jest od ufosforylowania jego cytoplazmatycznego inhibitora, I- κ B przez swoistą kinazę, IKK, co kieruje I- κ B na drogę degradacji w proteasomach umożliwiając tym samym translokację uwolnionego NF- κ B z cytoplazmy do jądra. Przed kilku laty wykazano, że

zahamowanie Hsp90 prowadzi do degradacji IKK, co tym samym inaktywuje antyapoptotyczny efekt NF κ B i prawdopodobnie prowadzi do śmierci komórki.

Przedstawione we „Wstępie” informacje są punktem wyjścia do podjęcia przez Doktorantkę badań dotyczących wyjaśnienia roli GELD w proapoptotycznym efekcie białka opiekuńczego Hsp90 na trzech modelowych hodowlach komórkowych: (i) stymulowanych fitohemaglutyniną (PHA) ludzkich limfocytach izolowanych z krwi obwodowej; (ii) komórkach Jurkat, unieśmiertelnionej linii ludzkiej białaczki T-limfocytarnej; (iii) zmodyfikowanych genetycznie komórkach Jurkat, które zostały stabilnie transfekowane dominująco negatywnym genem I κ B (komórki Jurkat-I κ BaM).

Rozdział „Materiały i metody” stanowi istotną część dysertacji. Doktorantka szczegółowo opisała metody uzyskiwania i hodowli wymienionych powyżej rodzajów komórek. Wyjściowe oraz transfekowane genem I κ B komórki Jurkat-I κ BaM uzyskano dzięki uprzejmości Dr. D.R. Green z La Jolla Institute of Allergy and Immunology (USA). Badaniom poddano niezsynchronizowane komórki znajdujące się w wykładniczej fazie wzrostu. Komórki inkubowano z rosnącymi stężeniami GELD (5-250 nM) przez okres od 6 do 96 godzin. Ocena rozmieszczenia komórek w cyklu komórkowym oraz zakres apoptozy przeprowadzono przy pomocy cytometrii przepływowej wykorzystując barwienie komórek oranżem akrydowym (AO), metachromatycznym barwnikiem fluorescencyjnym metodą opisaną przez Darżynkiewicza i wsp. w 2004 r.. Z kolei barwienie jodkiem propidyny (PI), barwnikiem interkalującym DNA, wykorzystano, po uprzedniej enzymatycznej degradacji komórkowego RNA, do oceny rozmieszczenia komórek w cyklu komórkowym. W mikroskopie epifluorescencyjnym obserwowano komórki, w których DNA specyficznie wiązał się z fluorochromem DAPI. Zakres apoptozy badano poprzez cytometryczną ocenę aktywności kaspazy 3 w połączeniu z pomiarem ilości DNA przy pomocy barwienia jodkiem propidyny. Wpływ GELD na fazę mitozy cyklu komórkowego oceniano przez cytofotometryczny pomiar zawartości w komórkach ufosforylowanej postaci histonu H3. Dla oceny proporcji komórek znajdujących się w cyklu komórkowym posłużono się cytofotometrycznym pomiarem zawartości hiprfosforylowanej postaci białka retinoblastoma (pRb). Uzyskane wyniki poddano właściwej analizie statystycznej.

Rozdział „Wyniki” zajmuje największą objętość pracy (31 stron). W fazie wstępnej badań oceniono wpływ GELD na ludzkie limfocyty stymulowane do podziałów przez silny

mitogen, PHA. Wykazano, że GELD w stężeniach 100 nM i 150 nM silnie hamowała rekrutację komórek z fazy G0 do cyklu komórkowego po 72 godz. inkubacji. Ocena odsetka subpopulacji komórek znajdujących się w fazie sub-G0/G1 zawierających pofragmentowany DNA, czyli komórek apoptotycznych, wykazała, że po 48 i 72 godz. inkubacji aktywowanych ludzkich limfocytów, GELD wyraźnie zwiększała odsetek komórek podlegających apoptozie przy zastosowaniu badanej metody. Także barwienie metodą DAPI wykazało znaczny odsetek apoptotycznych limfocytów inkubowanych z GELD (150 nM) przez 72 godz.. Te oraz dalsze doświadczenia pozwoliły na wykazanie, że GELD stymuluje przejście aktywowanych ludzkich limfocytów do fazy G0 cyklu komórkowego oraz jest w nich silnym induktorem apoptozy, przy czym obydwa te procesy są odwracalne po usunięciu GELD z medium hodowlanego. Dzięki zastosowanej metodyce badań możliwe było zmierzenie post hoc nie tylko odsetka komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego, ale także obliczenie bezwzględnej liczby limfocytów poddanych działaniu PHA i GELD oraz ich liczbowego udziału w fazach cyklu komórkowego.

W następnym etapie badań mgr M. Kajstura sprawdziła wpływ GELD na komórki Jurkat – unieśmiertelnioną linię ludzkiej białaczki T-limfocytarnej, które są powszechnie stosowane do badania cytostatycznego i cytotoksycznego wpływu różnych związków, na komórki nowotworowe. We wstępnych doświadczeniach ustalono przedział czasowy (8, 12, 24 i 48 godz.) prowadzonych obserwacji i zakres efektywnych stężeń GELD (100, 150 i 250 nM). W przeciwieństwie do aktywowanych limfocytów GELD nie zatrzymywała komórek Jurkat w fazie G0, po dłuższych czasach inkubacji zwiększała odsetek komórek w fazie G1 oraz hamowała cykl komórkowy w fazie G2 (a nie w fazie M, co wykazano poprzez pomiar fosforylacji histonu H3, charakterystycznej dla wczesnej fazy mitozy). Doktorantka wykazała, że zatrzymanie przez GELD komórek Jurkat w fazie G2 spowodowane było wyraźnym spadkiem ufosforylowania białka Rb, którego hiperfosforylacja jest niezbędnym warunkiem prawidłowego przebiegu wszystkich faz cyklu komórkowego. Podobnie jak w hodowlach aktywowanych ludzkich limfocytów, także w nowotworowych komórkach linii Jurkat GELD indukowała apoptozę, ocenianą poprzez odsetek komórek z podwyższoną aktywnością kaspazy 3, głównie w komórkach zatrzymanych w fazach G1 i G2/M cyklu komórkowego. Analiza post hoc liczebności komórek w poszczególnych fazach cyklu wykazała, że aktywacja apoptozy prowadziła do wielokrotnego, zależnego od stężenia GELD, zmniejszenia liczby żywych komórek.

Doskonałym pomysłem dla sprawdzenia hipotezy, że stymulacja NF- κ B spowodowana jego interakcją z Hsp90 może modulować efekty GELD na komórki nowotworowe, było

przeprowadzenie doświadczeń na zmodyfikowanych genetycznie komórkach Jurkat (komórki Jurkat-IkBaM). Komórki te zostały stabilnie transfekowane dominująco negatywnym genem kodującym białko IkB, które w prawidłowych warunkach hamuje aktywność NF-κB. Doktorantka wykazała, że w nieobecności funkcjonalnego czynnika transkrypcyjnego NF-κB GELD znacznie silniej indukowała apoptozę niż w komórkach kontrolnych z normalnie aktywnym NF-κB. Wyniki te zostały uzupełnione poprzez dane uzyskane w wyniku inkubowania komórek Jurkat z GELD i/lub partenolidem, inhibitorem NF-κB. Już po 8 godzinach inkubacji z partenolidem (5-20 nM) dochodziło do wyraźnego wzrostu odsetka komórek apoptotycznych (bez istotnego wpływu na rozmieszczenie komórek w cyklu komórkowym), przy czym inkubacja komórek z partenolidem i GELD przez 12 i 24 godziny prowadziła do częściowego zahamowania komórek w fazie S oraz do znacznego nasilenia apoptozy. Właściwe zastosowanie oranżu akrydyny pozwoliło w badaniu cytometrycznym określić nie tylko zawartość DNA i RNA w komórkach, ale także odsetek komórek apoptotycznych i nekrotycznych.

Należy podkreślić, że aby uwiarygodnić najważniejsze wyniki przedstawione skrótowo powyżej, Doktorantka przeprowadziła istotne eksperymenty metodyczne mające na celu wyjaśnienie, czy zawartość GELD w medium inkubacyjnym intensywnie dzielących się komórek nie będzie czynnikiem ograniczającym, tak więc sprawdzenie, czy stężenie GELD w dłuższych czasach inkubacji będzie stabilne. W tym celu komórki Jurkat i komórki Jurkat-IkBaM były testowane w trzech różnych protokołach doświadczalnych. W jednym z nich po 12 godzinach inkubacji z GELD w stężeniu 150 nM, komórki kilkakrotnie przemyto, uzyskano ich wyjściową gęstość, zawieszono w wyjściowym rozcieńczeniu i dodano GLD w tym samym stężeniu, po czym procedurę tę powtórzono jeszcze dwukrotnie w odstępach 12-godzinnych. W każdym z punktów czasowych analizowano właściwości komórek kontrolnych oraz poddanych działaniu GELD. Analiza statystyczna wyników uzyskanych w tych dodatkowych protokołach pozwoliła na stwierdzenie, że w kategoriach ilościowych ogólny wzór odpowiedzi na GELD był podobny dla obydwu typów badanych komórek i dla wszystkich protokołów. Zdaniem Doktorantki wyklucza to możliwość, że ewentualnie zmodyfikowana dostępność GELD dla badanych komórek w trakcie przedłużonych inkubacji mogłaby mieć wpływ na wyniki zasadniczych doświadczeń.

Uzyskane wyniki badań mgr Małgorzata Kajstura poddała w „Dyskusji” konfrontacji z rezultatami badań innych autorów, jednak w odniesieniu do innych rodzajów nowotworów i

innych linii komórkowych, ponieważ zastosowany przez Doktorantkę model badawczy nie był jeszcze testowany, ma więc charakter oryginalny. Punkt wyjścia do dyskusji stanowi omówienie potencjalnego wpływu białka Hsp90 i GELD na cykl komórkowy i apoptozę. W oparciu o ograniczone dane literaturowe formułuje hipotezę według której zahamowanie cyklu komórkowego przez GELD w badanych liniach komórkowych Hsp90 może być związane z bezpośrednim oddziaływaniem HSP90 z białkiem p53 lub z białkiem Mdm2, które jest ujemnym regulatorem p53. Mgr M. Kajstura wskazuje też, że Hsp90 może zmniejszać ekspresję cykliny D oraz cdk4 i w ten sposób hamować fosforylację białka RB niezbędną do wyjścia komórek z fazy G1. Te oraz inne propozycje tłumaczące zahamowanie przez Hsp90 przejścia komórek Jurkat z fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego zostały w jasny sposób zobrazowane na schemacie. Oczywiście, stwierdzenie ich poprawności wymagałoby dalszych badań eksperymentalnych. Kolejnym zagadnieniem poruszonym w Dyskusji jest potencjalny mechanizm wpływu GELD i HspP90 na stymulację apoptozy zarówno w hodowlach komórek Jurkat jak i w ludzkich limfocytach. Ponieważ inni autorzy wykazali, że „klientami” białka Hsp90 jest zarówno proapoptotyczne białko Bax, jak i antyapoptotyczne białka Bcl-2 oraz Bcl-x2, kwestia ta na poziomie zastosowanych przez Doktorantkę metod badawczych nie została przekonująco wyjaśniona.

W przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej trudno znaleźć słabe strony. Mgr Małgorzata Kajstura bardzo precyzyjnie określiła temat i zakres prowadzonych przez siebie badań dobierając określone, hodowane w zawiesinie linie komórkowe. Dzięki temu mogła zastosować doprowadzone do technicznej perfekcji metody cytometrii przepływowej do oceny wpływu geldanamycyny, swoistego inhibitora białka chaperonowego Hsp90 na cykl komórkowy i apoptozę w nowotworowej i prawidłowej linii limfocytarnej. W efekcie przedstawioną do oceny rozprawę doktorską mgr Małgorzaty Kajstury oceniam wysoko. Wykazała Ona, że w aktywowanych ludzkich limfocytach geldanaycyna, inhibitor białka opiekuńczego Hsp90, indukuje wyjście komórek z cyklu komórkowego i ich przejście do fazy G0, a także indukuje apoptozę, chociaż w mniejszym zakresie. W nowotworowej linii komórek Jurkat GELD zahamowuje cykl komórkowy poprzez zatrzymanie komórek w fazie G1 i silną stymulację apoptozy. Badania na zmodyfikowanych komórkach Jurkat-IkBaM wykazały, że proapoptotyczny efekt ulega silnemu wzmocnieniu poprzez jednoczesne zahamowanie aktywności czynnika transkrypcyjnego NF-κB. Uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie oryginalnej hipotezy dotyczącej nowego mechanizmu przeciwnowotworowego działania geldanamycyny, a być może także jej syntetycznych analogów.

Podsumowując, uważam, że przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Małgorzaty Kajstury pt. „Effects of Geldanamycin, a Ligand of Heat Shock Protein 90, on Cell Cycle Progression and Induction of Apoptosis in Human Lymphocytes and Jurkat Cells ” w pełni spełnia kryteria rozpraw na stopień doktora i z pełnym przekonaniem przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie mgr Małgorzaty Kajstury do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

K I E R O W N I K
Katedry i Zakładu Histologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
prof. dr hab. n. med. Zbigniew Kmiec

