

## Opinia

o rozprawie doktorskiej mgr. Krzysztofa Wójcika

### 1. Podstawowe dane

Mgr Krzysztof Wójcik przedstawił rozprawę doktorską zatytułowaną „Wpływ związków wykazujących powinowactwo do DNA na wiązanie histonów do kwasu deoksyrybonukleinowego oraz strukturę chromatyny i jądra żywych komórek ludzkich”. Praca została wykonana w Pracowni Biofizyki Komórki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ. Promotorem rozprawy jest prof. dr hab. Jerzy Dobrucki.

### 2. Opinia o rozprawie doktorskiej

Rozprawa jest obszerną monografią podzieloną na wstęp, materiały i metody, cele doświadczeń, wyniki, dyskusję, wnioski i literaturę. W rozprawie Autor wykorzystał komórki zawierające histony wyznakowane fluorescencyjnie białkiem eGFP oraz zaawansowane metody mikroskopowe. Opisał wpływ różnych substancji niekowalencyjnie wiążących się z DNA na strukturę chromatyny i oddziaływanie histonu łącznikowego i histonów korowych z DNA w żywych komórkach.

Celem doświadczeń wykonanych przez Autora było zbadanie skutków niekowalencyjnego wiązania wybranych związków z DNA w żywych komórkach, wpływ tych związków na strukturę chromatyny, oddziaływanie białek histonowych z DNA oraz na procesy transkrypcji i replikacji w badanych obiektach. Celem było również porównanie wpływu wiązania cząsteczek o różnym mechanizmie łączenia się z DNA, na oddziaływanie histonów z DNA i poszerzenie wiedzy o mechanizmie cytotoksycznego działania leku przeciwnowotworowego daunomycyny oraz zbadanie wyniku jej oddziaływania z chromatyną żywych komórek *in vitro* w stężeniach leku istotnych z klinicznego punktu widzenia.

Dla osiągnięcia zaplanowanych celów Autor wykorzystał komórki HeLa oraz linie komórek BALB/c 3T3 transfekowane plazmidami tak, by komórki miały ekspresję histonów eGFP-H1.1 i eGFP-H2B. W ten sposób obecność i translokacje histonów H1.1

łącznikowych oraz H2B korowych można było śledzić w komórkach żywych oraz po ich utrwaleniu. W analizach wykorzystał cytometrię przepływową po inkubacji z pochodnymi antracyklin np. daunomycyną. W tych badaniach wykorzystał też mikroskopię konfokalną. Dynamikę histonów zbadał metodą FRAP. Replikację DNA po inkubacji z różnymi stężeniami daunomycyny Autor określał wbudowaniem bromodeoksyurydyny (BrdU) wykrywanej odpowieniem przeciwciałem monoklonalnym po utrwaleniu komórek i permeabilizacji ich błon komórkowych. Podobnie transkrypcję RNA zbadał włączaniem do komórek bromouracydyny (BU) wykrywanej swoistymi przeciwciałami.

Autor obserwował, że substancje interkalujące do DNA wywołują agregację chromatyny nawet w niskim stężeniu 5 nM. Zauważył, że wśród interkalatorów pochodne antracyklin, daunaomycyna czy DRAQ5, silnie wpływają na oddziaływanie białek histonowych z DNA oraz powodują duże zaburzenia rozkładu chromatyny w jądrach żywych komórek. Związki wiążące się w mniejszym rowku podwójnej helisy DNA powodowały jedynie niewielkie zmiany struktury chromatyny. Obserwował również ubytek histonu łącznikowego i jego translokację do jąder w żywych komórkach pod wpływem niskich stężeń daunomycyny. Korelowało to z mniejszą przeżywalnością komórek przy długotrwałej obserwacji. Wnioskował na podstawie obserwacji, że histon H1 jest stabilizatorem wysokorzędowych struktur chromatyny oraz podlega dynamicznej wymianie.

Autor rozprawy bardzo umiejętnie wykorzystał możliwości obserwowania translokacji różnych histonów wyznakowanych eGFP w żywych komórkach. Przedyskutował krytycznie obserwowany wpływ pochodnych antracyklinowych na oddziaływania białek histonowych z DNA. Oceniał też hamowanie i zaburzenia przestrzennego rozkładu replikacji i transkrypcji przez badane związki wiążące się z DNA i przedstawił schematy mechanizmów cytotoksycznego działania daunomycyny przy różnych stężeniach leku. Wśród wniosków wydaje mi się szczególnie ważne stwierdzenie, że oddysocjowanie histonu H1 od DNA występuje w stężeniach terapeutycznych stosowanego klinicznie leku daunomycyny.

Na osobne podkreślenie zasługuje staranna szata edytorska pracy. Nieliczne drobne usterki jak np. brak w „Literaturze” niektórych prac wymienionych w tekście (str.12,13) mogą być łatwo uzupełnione.

W podsumowaniu oceniam, że prezentowana praca mgr. Krzysztofa Wójcika w pełni odpowiada wymogom stawianym dla rozpraw doktorskich. Stanowi ona nowe rozwiązanie wybranych problemów naukowych w dziedzinie medycyny oraz biologii komórki. Z prawdziwą przyjemnością przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ wniosek o dopuszczenie doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę nowatorskie aspekty rozprawy oraz różnorodność zastosowanych modeli badawczych praca ta wyróżnia się, w mojej ocenie, wśród rozpraw doktorskich i zasługuje na nagrodę.



Prof.dr hab. Jerzy Kawiak