



Ocena rozprawy doktorskiej Pan Krzysztofa Wójcika
pt. „Wpływ związków wykazujących powinowactwo do DNA na
wiązanie histonów do kwasu deoksyrybonukleinowego oraz strukturę
chromatyny i jądra żywych komórek ludzkich”

Związki chemiczne wiążące się w komórce z kwasami nukleinowymi są od lat wykorzystywane zarówno w badaniach naukowych jak i w praktyce klinicznej. Mamy tutaj z jednej strony szeroką paletę związków stosowanych jako barwniki DNA, znaczniki komórek czy inhibitory rozmaitych procesów komórkowych, a z drugiej cytostatyki stosowane z mniejszym lub większym powodzeniem w leczeniu wielu typów nowotworów. Badania dotyczące interakcji tych małych cząsteczek z DNA należą do priorytetowych działań prowadzonych przez liczne laboratoria naukowe jak i firmy farmaceutyczne, ponieważ lepsze zrozumienie mechanizmów tych oddziaływań może być kluczowe dla opracowania wydajniejszych leków przeciwnowotworowych. Nie bez znaczenia jest również fakt, że związki o wspomnianych właściwościach są powszechnie stosowane w praktyce laboratoryjnej i pełniejsze zrozumienie ich działania może ustrzec badaczy przed niewłaściwą interpretacją otrzymanych przy ich pomocy wyników.

W swoich badaniach Pan Krzysztof Wójcik podjął próbę zbadania skutków wiązania wybranych niskocząsteczkowych związków chemicznych oddziałujących z DNA na strukturę chromatyny, lokalizację białek histonowych oraz procesy transkrypcji i replikacji. W swoich badaniach szczególną uwagę poświęcił mechanizmowi działania jednego z szeroko stosowanych w chemioterapii leków: daunomycyny. Przedstawiona do oceny praca wpisuje się zatem we wcześniejsze i aktualnie prowadzone badania prowadzone przez grupę prof. dr hab. Jerzego Dobruckiego w Pracowni Biofizyki Komórki WBBB UJ, a podjęcie tej tematyki badawczej przez doktoranta wydaje się być ze względów naukowych i także czysto praktycznych interesujące i jak najbardziej uzasadnione. Na podkreślenie zasługuje również fakt, że swoje badania doktorant przeprowadził w zespole, który od wielu lat zajmuje się tą tematyką, co niewątpliwie

Wydział Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biologii Komórki

Kierownik Zakładu:

prof. dr hab. Zbigniew Madeja

Ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48(12) 664 61 42

fax +48(12) 664 69 02

e-mail: z.madeja@uj.edu.pl

przyczyniło się do otrzymania przez autora spójnych i wiarygodnych wyników.

Przedstawiona do oceny praca doktorska liczy 98 stron. W tekście zamieszczono 39 rycin, 1 tabelę i cytowano 121 pozycji literaturowych. Rozprawa jest więc objętościowo raczej niezbyt rozbudowana. Autor unika co prawda zbędnych dywagacji na tematy nie związane bezpośrednio z przedmiotem pracy jednak rozdziały: Materiały i Metody oraz Wyniki są napisane chyba zbyt lakonicznie i trochę z tego powodu tracą. Nadrabia to jednak bardzo dobrze napisana Dyskusja. W sumie jednak, dzięki zwięzłej prezentacji, prace czyta się dobrze, nie tracąc z oczu głównego jej celu. Rozprawa doktorska Pana Krzysztofa Wójcika ma typowy dla tego typu opracowań układ. Może z wyjątkiem umieszczenia celu pracy po rozdziale Materiały i Metody, co chyba nie jest najszcześniejszym rozwiązaniem, gdyż właśnie Wstęp powinien prowadzić do jasno postawionego celu pracy.

W krótkim, 17 stronicowym, „Wstępie” autor przedstawił właściwie przygotowany zestaw informacji ułatwiający czytelnikowi zrozumienie całości pracy. W tym rozdziale Doktorant w syntetyczny sposób przedstawia najważniejsze dane dotyczące związków niekowalencyjnie wiążących DNA i omawia strukturę chromatyny ze szczególnym uwzględnieniem roli białek histonowych w jej organizacji. Następnie podaje najważniejsze informacje dotyczące badanych w pracy związków wiążących DNA. Sposób napisania tego rozdziału świadczy o bardzo dobrej orientacji Doktoranta w zagadnieniach będących przedmiotem recenzowanej rozprawy. Wydaje się jednak, że pierwsza część wstępu mogłaby być trochę bogaciej ilustrowana.

W rozdziale „Materiały i metody” autor zawiera informacje dotyczące stosowanych metod eksperymentalnych oraz wykorzystanego materiału biologicznego. Rozdział liczy jedynie 6 stron i jest jak na pracę doktorską napisany jest chyba zbyt skrótowo. Przez to nie wszystkie procedury są jasne dla czytelnika do czego wróć jeszcze w dalszym ciągu recenzji. W swoich badaniach Autor stosował przede wszystkim metody mikroskopowe w tym mikroskopię konfokalną i technikę FRAP. Techniki te oprócz wizualizacji komórek służyły do badania dynamiki histonów, replikacji DNA i syntezy DNA. Oprócz tego Doktorant stosował techniki cytometrii przepływowej, ilościowy pomiar RNA w komórce oraz test MTT do określania przeżywalności komórek. Metody te wydają się być właściwe do rozwiązania problemu będącego przedmiotem rozprawy doktorskiej. Jednak opis stosowanych metod nie zawsze jest wystarczający. Np. na stronie 30 w pkt 3.10 Autor pisze, że „po 24 h zmieniano pożywkę na nowe medium”. Nie jest jednak jasne czy chodzi o medium z daunomycyną czy bez. Rzec wyjaśnia się dopiero 40 stron dalej.

W kolejnym rozdziale Doktorant jasno i rzeczowo przedstawia cele swojej pracy.

W rozdziale „Wyniki” Autor przedstawił główne osiągnięcia swoich badań. W pierwszej części pracy Doktorant charakteryzuje zaburzenia oddziaływań białek histonowych z DNA oraz zmiany struktury chromatyny w komórce wywołane przez związki interkalujące z

DNA takie jak daunomycyna, DRAQ5, aktynomycyna D i bromek etydyny. Do najważniejszych obserwacji dokonanych w tej części pracy należy wykazanie, że daunomycyna powoduje oddysocjowanie histonu H1 od DNA oraz agregację chromatyny a DRAQ5 indukuje oddysocjowanie histonów korowych i histonu H1 oraz zniszczenie wysokorzędowych struktur chromatyny. Z kolei bromek etydyny wpływał jedynie na zmianę struktury chromatyny bez zaburzeń oddziaływania histonów z DNA a aktynomycyna D powodowała agregację chromatyny. Wnioski te są dobrze udokumentowane, jednakże kilka punktów wymaga wyjaśnienia. Autor w swojej pracy używa kilku linii komórkowych dlatego wskazane byłoby podawanie informacji na jakiej linii zrobiono konkretne eksperymenty. Takiej informacji brakuje w podpisie rys 5.1. Przy analizie zdjęć prezentowanych w tej rycinie nasuwa się również pytanie o przyczynę tak słabej jakości zdjęć w świetle przechodzącym? Nie jest również jasne co przedstawia na rys 5.2 B intensywność fluorescencji, czy jest to średnia fluorescencja na komórkę, na obraz czy na jednostkę powierzchni? Z opisu doświadczeń prezentowanych na rys 5.3 trudno wywnioskować po jakim czasie od dodania daunomycyny dokonywano pomiaru. Ta uwaga dotyczy również kilku innych doświadczeń, w których nie podano tej informacji. Nie do końca jest również zrozumiałe w wynikach przedstawionych na rys 5.11 co Autor ma na myśli używając stwierdzenia stopniowe zwiększanie stężenia bromku etydyny? Czy chodzi tutaj o stopniowe zwiększanie ilości bromku etydyny w jednym układzie badawczym w czasie doświadczenia?

Kolejne eksperymenty pozwoliły Doktorantowi na zobrazowanie subtelnych zmian struktury chromatyny w żywych komórkach przez związki wiążące DNA w mniejszym rowku podwójnej helisy – barwników SYTO17 i Hoechst 33258 oraz nieznaczną agregację chromatyny wywołaną działaniem cis i trans platyny. Co ciekawe cis platyna nie indukowała oddysocjowania histonów od DNA.

Otrzymane metodami mikroskopowymi wyniki wskazujące, że daunomycyna i DRAQ5 indukują w żywych komórkach oddysocjowanie histonów od DNA zostały w kolejnych eksperymentach ilościowo potwierdzone metodami cytometrii przepływowowej. Nie sposób nie zgodzić się tutaj z Autorem, że pomiary zmian fluorescencji wykonywane metodami mikroskopowymi są obarczone dużą niedokładnością wynikającą z chociażby różnego stopnia ekspresji histonów znakowanych GFP w obrębie populacji komórek. Jednakże trzeba pamiętać, że wiele przedstawionych w pracy doświadczeń dotyczy zmian obserwowanych w pojedynczej komórce w trakcie eksperymentu. Przy tak prowadzonym doświadczeniu ten problem nie powinien mieć większego znaczenia. Prosiłbym również Autora o wyjaśnienie jak należy interpretować przedstawione na rys 5.15 A ujemne wartości intensywności fluorescencji/komórkę dla H1-GFP przy wyższych stężeniach daunomycyny oraz czy prezentowane dane były poddane jakiegóż analizie statystycznej?

W kolejnych eksperymentach Autor zastosował technikę FRAP do badania dynamiki histonu H1 i H2B w żywych komórkach pod wpływem daunomycyny i DRAQ5. Pierwsze doświadczenia wskazały, że po 4 godzinnej inkubacji w obecności daunomycyny nie ma różnicy w dynamice wymiany histonu H1 w odniesieniu do próby kontrolnej. Co ciekawe, w doświadczeniach, w których inkubacja z daunomycyną trwała jedynie 30 min stwierdzono, że tempo powrotu fluorescencji jest znacznie szybsze niż przy inkubacji 4 godzinnej. Również, w przypadku badań dynamiki wymiany zmutowanych histonów H1 w większości przypadków nie stwierdzono różnic pomiędzy komórkami traktowanymi daunomycyną i komórkami kontrolnymi. Takie różnice stwierdzono jedynie dla mutanta K69A. Również te wyniki pokazywane jako zmiana czasu osiągnięcia 50% maksymalnej intensywności fluorescencji podane zostały bez żadnych parametrów statystycznych. Jak jest tego przyczyna?

Kolejne rozważania przedstawione w pracy dotyczyły wpływu związków niekowalencyjnie wiążących DNA na procesy replikacji i transkrypcji w żywych komórkach. Wyniki tych doświadczeń jednoznacznie pokazują, że zarówno związki interkalujące do DNA jak i wiążące się w mniejszym rowku podwójnej helisy indukują zahamowanie syntezy zarówno RNA jak i DNA w komórce.

Ostatnią część rozdziału Wyniki Autor poświęcił próbie określenia rzeczywistego mechanizmu cytotoksycznego działania daunomycyny mającego miejsce w takich stężeniach tego leku jakie mogą być osiągnięte klinicznie. W tym celu, stosując stężenia z zakresu 25-250 nM, zbadał fosforylację histonu H2AX, syntezę DNA i RNA w komórkach oraz przeżywalność komórek. Fosforylację histonu H2AX, która jest markerem dwuniciowych pęknięć DNA, można było już zaobserwować w obecności 25 nM daunomycyny, jednakże bazując zarówno na danych literaturowych jak i innych swoich obserwacjach Autor stawia tezę, że powodem pojawienia się ufosforylowanej formy histonu H2AX jest wystąpienie zaburzeń w strukturze chromatyny spowodowane oddysocjowaniem histonu H1 a nie wystąpieniem dwuniciowych pęknięć DNA. Z drugiej strony wykazano, że lek w stężeniach klinicznych nie powoduje zahamowania syntezy DNA ani RNA jak również nie wpływa na przeżywalność mierzoną testem MTT. Jednakże, długotrwała obserwacja komórek traktowanych daunomycyną wyraźnie wskazuje na jej toksyczne działania o czym świadczy obserwacja zmian morfologicznych komórek po 192 godzinie inkubacji. Obserwacja ta potwierdza liczne zastrzeżenia do test MTT jako miarodajnego narzędzia do określania przeżywalności komórek. Jednocześnie nasuwa się pytanie dlaczego autor nie zdecydował się na zastosowanie jakiegoś testu żywotności po tym czasie inkubacji? Ponieważ Autor sam zwraca uwagę, że stężenie daunomycyny przy podawaniu w warunkach klinicznych osiąga początkowo stężenie 1-2 μM a dopiero po godzinie spada do 25-250 nM, chciałbym spytać czy nie brał pod uwagę właśnie takiego układu doświadczalnego, w którym lek byłby podawany *in vitro* w stężeniu 2 μM na godzinę a

następnie stężenie byłoby obniżane do 25-250 nM. Być może byłby to układ bardziej zbliżony do sytuacji obserwowanej *in vivo*?

Prace kończy bardzo dobrze napisana dyskusja. W rozdziale tym autor krytycznie i ostrożnie ocenia własne wyniki na tle danych literaturowych wskazując na różne możliwości interpretacji wyników własnych jak również innych badaczy. Rozprawę kończy rozdział „Wnioski”, w którym przedstawiono główne osiągnięcia badawcze i konkluzje płynące z przeprowadzonych badań.

Podsumowując, Autor przedstawił niezwykle interesujące i oryginalne wyniki naukowe w znaczący sposób rozszerzające naszą wiedzę na ten temat. Otrzymane wyniki wskazują, że badane związki zaburzają strukturę chromatyny, związki interkalujące robią to wydajniej niż substancje wiążące się w mniejszym rowku helisy DNA a badane antracykliny indukują oddysocjowanie histonu łącznikowego i korowego od DNA oraz zaburzają procesy replikacji i syntezy DNA. Obserwacje te oprócz pełniejszego wyjaśnienia działania wybranych leków antynowotworowych wskazują, że powszechnie stosowane barwniki fluorescencyjne mogą powodować szereg efektów ubocznych mogących wpływać na interpretację wyników eksperymentów.

Przedstawiona do oceny praca jest starannie przygotowana pod względem edytorskim. Przedstawione zdjęcia i ryciny są czytelne i przejrzyste. W pracy znalazłem stosunkowo niewielką liczbę błędów literowych, które jednak zawsze w tego typu opracowaniach się zdarzają i nie ma chyba potrzeby ich tutaj wymieniać. Przedstawione tutaj uwagi nie wpływają na bardzo pozytywną ocenę całej pracy doktorskiej.

Warto podkreślić, że wyniki pracy doktorskiej zostały już opublikowane w 2 artykułach, które ukazały się drukiem w bardzo dobrych czasopismach (Cytometry A i Cancer Biology & Therapy) i w obu pracach Doktorant jest pierwszym autorem. Prace te były już 28 razy cytowane w literaturze światowej.

Podsumowując, zarówno dorobek naukowy jak i rozprawę doktorską Pana Krzysztofa Wójcika oceniam bardzo wysoko. W moim przekonaniu autor uzyskał wartościowe, stanowiące nowość naukową wyniki, które otwierają szerokie perspektywy badawcze na przyszłość. Przedstawiona do oceny praca spełnia wymogi rozprawy doktorskiej. Wnoszę zatem o dopuszczenie przez Wysoką Radę Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Pana Krzysztofa Wójcika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


(Zbigniew Madeja)