

## **Streszczenie rozprawy doktorskiej:**

**Wpływ związków wykazujących powinowactwo do DNA na wiązanie histonów do kwasu deoksyrybonukleinowego, oraz strukturę chromatyny i jądra żywych komórek ludzkich.**

**Lek med. Krzysztof Wójcik, Pracownia Biofizyki Komórki**

**(Promotor: Prof. dr hab. Jerzy Dobrucki)**

Celem wykonanych badań było zbadanie wpływu związków niekowalencyjnie wiążących się z DNA w jądrach żywych komórek na:

- oddziaływanie białek histonowych z kwasami nukleinowymi
- organizację wysokorzędowych struktur chromatyny i jądra żywych komórek
- zachodzenie i subkomórkową lokalizację procesów replikacji i transkrypcji

W przeprowadzonych doświadczeniach wykorzystano metody mikroskopii fluorescencyjnej i konfokalnej (FRAP, FLIP, i in.), techniki immunofluorescencyjne oraz cytometrię przepływową. Eksperymenty prowadzono na komórkach HeLa z histonami H1, H2B, H3 i H4 wyznakowanymi białkiem GFP oraz komórkach 3T3 ze zmutowanymi histonami H1 zawierającymi pojedyncze zmienione aminokwasy. Zmutowane histony H1 również były wyznakowane białkiem GFP. Badano związki chemiczne należące do dwóch grup, różniących się mechanizmem wiązania z DNA. Pierwszą z nich były substancje interkalujące, do których należą: daunomycyna – lek przeciwnowotworowy z grupy antybiotyków antracyklinowych; DRAQ5 - barwnik fluorescencyjny również należący do grupy antracyklin, oraz bromek etidiowy. Drugą grupę stanowiły barwniki wiążące się z DNA w małym rowku podwójnej helisy – Syto17 (pochodna cyjanin) oraz Hoechst 33342.

Wykonane eksperymenty pokazały, że związki z grupy antracyklin (przy stężeniach ok. 1  $\mu\text{M}$ ) interkalując do DNA powodują oddysocjowanie cząsteczek histonu H1 z chromatyny, a w wyższych stężeniach (3-7  $\mu\text{M}$ ) także histonów korowych. Usunięcie histonów H1 z chromatyny żywych komórek prowadziło do silnego zaburzenia wysokorzędowych struktur chromatyny i przestrzennego rozkładu chromatyny w jądrze, oraz do jej agregacji. W badaniach tzw. dynamicznej wymiany

histonów H1, bezpośrednio po dodaniu daunomycyny zaobserwowano przejściowe pojawienie się populacji białka niezwiązanego z DNA. Po 4 h inkubacji pula niezwiązanego histonu zanikła, a dynamiczna wymiana histonów H1, które pozostały związane ze zagregowaną chromatyną była taka sama jak w komórkach kontrolnych. Zaobserwowano również zależne od stężenia zahamowanie procesów replikacji i transkrypcji w komórkach traktowanych tymi związkami.

Barwniki wiążące się w małym rowku podwójnej helisy nie powodowały oddysocjowania histonów od DNA, ani zmian rozkładu chromatyny w jądrach badanych komórek. Należy zatem przypuszczać, że nie powodowały one istotnych zmian wysokorzędowych struktur chromatyny. Zahamowanie procesów replikacji i transkrypcji obserwowano tylko po inkubacji komórek z dużymi stężeniami tych barwników (ponad 5  $\mu\text{M}$ ).

Zaobserwowane zjawiska wpływu barwników i leków wiążących się z DNA żywych komórek na strukturę chromatyny potwierdzają kluczową rolę histonu H1 w utrzymywaniu wysokorzędowych struktur chromatyny *in vivo*. W przypadku barwników używanych do barwienia DNA wykazano, że zaburzają one wysokorzędowe struktury chromatyny, zatem w sposób istotny zmieniają badany układ. W badaniach leku przeciwnowotworowego daunomycyny oddysocjowanie histonu H1 i agregacja chromatyny były obserwowane już w niskich stężeniach (0.05 – 0.25  $\mu\text{M}$ ) istotnych z klinicznego punktu widzenia. Zatem zmiany oddziaływania histon-DNA wywołane przez interkalujący lek mogą być istotnym elementem ciągle niewyjaśnionego mechanizmu cytotoksycznego działania daunomycyny.

Spis publikacji, na podstawie których przygotowana została rozprawa:

Wojcik K, Zarebski M, Cossarizza A, Dobrucki JW Daunomycin, an antitumor DNA intercalator, influences histone-DNA interactions *Cancer Biol Ther*, Jun 2013;14(9)

Wojcik K, Dobrucki JW. Interaction of a DNA intercalator DRAQ5, and a minor groove binder SYTO17, with chromatin in live cells - influence on chromatin organization and histone - DNA interactions. *Cytometry Part A* 2008;73(6):555-62.