nencki institute
of experimental biology

POLISH ACADEMY OF SCIENCES
NENCKI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL BIOLOGY

Pasteur 3, 02-093 Warsaw, Poland
Phone: (48-22) 58 92 000; Fax: (48-22) 822 53 42
E-mail: sekretariat@nencki.gov.pl; http://www.nencki.gov.pl

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Kajstury „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 pani mgr Małgorzaty Kajstury przedstawia wyniki badań przeprowadzonych przez doktorantkę w Brander Cancer Research Institute, New York Medical College w USA. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Jerzy Dobrucki.

Tematyka pracy dotyczy zagadnień związanych z badaniem wpływu inhibitorów białka szoku cieplnego HSP90 na regulację cyklu komórkowego i śmierci komórek, a także, w kontekście badań translacyjnych, z poszukiwaniem związków wpływających cytostatycznie lub cytotoksycznie na komórki białaczkowe, poprzez hamowanie HSP90. To aktualne tematy badań i praca wpisuje się w nie bardzo dobrze, szczególnie biorąc pod uwagę toczące się testy kliniczne z wykorzystaniem geldanamycyny.

Celem pracy była weryfikacja hipotezy mówiącej, że geldanamycyna – ligand białka szoku cieplnego HSP90 może wpływać na regulację cyklu komórkowego i w efekcie prowadzić do zaburzeń podziałów komórkowych. Mimo wprowadzenia geldanamycyny do etapu testów klinicznych, wiedza na temat wpływu tego związku na regulację cyklu komórkowego jest bardzo niekompletna. Doktorantka skupiła się na badaniach wpływu geldanamycyny na cykl komórkowy i apoptozę, wykorzystując dwa główne modele badawcze - prawidłowe limfocyty krwi oraz komórki białaczkowe linii Jurkat. W przypadku komórek krwi, były one stymulowane do proliferacji mitogenem – fitochemaglutyniną (PHA). W celu określenia udziału czynnika NFκB w obserwowanych procesach, doktorantka włączyła do badań linię komórek Jurkat (IκBαM), w której ekspresji ulegała zmutowana, nie ulegająca degradacji forma inhibitora IκB, uniemożliwiając aktywację czynnika NFκB, oraz roślinny inhibitor NFκB – partenolid. Cele pracy określono jasno i klarownie, a modele badawcze dobrano prawidłowo.

W pracy wykorzystano szeroki wachlarz dobrze dobranych metod cytometrycznych, pozwalających na ilościową ocenę odsetków komórek znajdujących się w różnych populacjach. Wiele ze stosowanych metod z zakresu cytometrii przepływowej zostało opracowanych w laboratorium prof. Darzynkiewicza, jednego z pionierów w zakresie wykorzystania cytometrii przepływowej w badaniach cyklu komórkowego i apoptozy. W laboratorium tym doktorantka wykonała część eksperymentalną przedstawionej do oceny pracy.

Za najważniejsze osiągnięcia tej rozprawy uważam:

1. Uzyskanie wyników wskazujących na wpływ geldanamycyny na przejście G0/G1 cyklu komórkowego
2. Wykazanie, że zahamowanie czynnika transkrypcyjnego NFκB, w połączeniu z geldanamycyną potęguje efekt cytostatyczny i cytotoksyczny. Wskazuje to być może na nowe funkcjonalne powiązania pomiędzy

szlakami zależnymi od HSP90 i NFκB w regulacji cyklu komórkowego wywołanej geldanamycyną i nowe potencjalne kierunki w terapiach łączonych.
3. Dostarczenie danych wskazujących, że geldanamycyna może być potencjalnym związkiem rozpatrywanym w kontekście terapii białaczek, a badania dotyczące jej zastosowania w białaczkach powinny być kontynuowane.

Szczegółowe uwagi i komentarze

Praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Zawiera Streszczenie, Wykaz skrótów, Spis treści, po których następują Wstęp, Materiały i Metody, Wyniki i Dyskusja. Pracę kończy Spis literatury. W pracy zabrakło Podsumowania i Wniosków wynikających z uzyskanych wyników. Prosiłabym o przedstawienie ich w prezentacji w trakcie obrony pracy.

We Wstępie doktorantka omawia to, co niezbędne czytelnikowi, aby zostać wprowadzonym w tematykę rozprawy. Przedstawia więc strukturę i biosyntezę geldanamycyny, opisuje strukturę i działanie HSP90, jego interakcje z geldanamycyną oraz znaczenie HSP90 w regulacji cyklu komórkowego i śmierci komórek. Opisuje także krótko przesłanki wskazujące na regulatorowe interakcje pomiędzy HSP90 a szlakiem sygnałowym zależnym od NFκB. To, czego mi zabrakło we Wstępie, to schemat pokazujący wielofunkcyjność HSP90 i jego wpływ na wiele procesów w komórce, nie tylko cykl komórkowy i apoptozę. Dałoby to czytelnikowi pojęcie o kluczowym znaczeniu tego białka dla funkcjonowania komórek, a szczególnie komórek nowotworowych.

Większość metod została opisana prawidłowo, z dbałością o szczegóły umożliwiające odtworzenie procedur. Różnorodność zastosowanych metod nie jest najmocniejszą stroną pracy. Doktorantka ograniczyła się do metod hodowli komórkowych z wykorzystaniem komercyjnie dostępniej linii komórkowej Jurkat, w tym z mutacją IκBαM i pierwotnych komórek krwi (PBMC) stymulowanych do podziałów PHA oraz szeregu metod i testów bazujących na cytometrii przepływowej. Trzeba jednak oddać, ze w tym zakresie zastosowała wiele różnych metod stosowanych przyżyciowo jak i po utrwaleniu komórek i oznaczała: przeżywalność i apoptozę, cykl komórkowy za pomocą różnych metod barwienia (w tym z wykorzystaniem Oranżu Akrydyny, umożliwiającym rozróżnienie faz G0 i G1), oznaczenie frakcji komórek mitotycznych, aktywację kaspazy 3, syntezę DNA i poziom białek wewnątrzkomórkowych, w tym ich form ufosforylowanych. Świadczy to o posiadanej ekspertyzie i dużej znajomości technik cytometrycznych oraz swobodnym poruszaniu się doktorantki w tym zakresie. Wszystkie zastosowane metody pozwoliły na zbadanie szerokiego spektrum zachodzących procesów komórkowych i odpowiedź na zadane pytania badawcze. Istotne jest także to, że zastosowanie metod cytometrycznych umożliwiło przeprowadzenie analiz na poziomie pojedynczych komórek i wyodrębnienie poszczególnych subpopulacji w obrębie całej populacji badanych komórek, co jest przewagą metod cytometrycznych nad innymi, bazującymi na badaniu całej populacji komórek. W przypadku zaplanowanych przez doktorantkę badań, metodologia ta okazała się wystarczająca i pozwoliła zarówno na statystyczną analizę, jak i wysnucie wniosków. Więc pomimo, iż doktorantka nie stosowała szerokiego wachlarza różnych technik a bazowała na cytometrii, dobór metodologii do zaplanowanych badań i zadanych pytań naukowych był prawidłowy.

Do tej części mam drobne uwagi. W przypadku oznaczeń z wykorzystaniem przeciwciał (ufosforylowana forma białek Rb i histonu H3), nie podano informacji na temat kontroli negatywnych. Nie podano także rozcieńczenia/stężenia stosowanego przeciwciała pierwszorzędowego. Czy stosowane stężenia ustalano na podstawie serii rozcieńczeń kontrolnych (tzw. „titration")? Nie do końca przekonuje mnie wyliczanie ilości

komórek („cell number calculation"), w oparciu o bardzo nieprecyzyjne wartości przeanalizowanej objętości (nie znamy, ani nie podano objętości tzw. „martwej/straconej" w przypadku cytometru FACScan), także ilość przeanalizowanych komórek/obiektów („events") nie obejmuje wszystkich pobranych z probówki, w której oznaczano gęstość zawiesiny komórek. Prosiłabym o komentarz, czy używany typ urządzenia pozwala na taką analizę oraz lepsze wyjaśnienie założeń tych kalkulacji. W opisie statystyki podano, że wartości $p<0,05$ uznawano za statystycznie istotne. W Wynikach znalazły się jednak istotności statystyczne oznaczone jedną, dwoma, a na niektórych rycinach – np. 9C – także trzema gwiazdkami, a w opisie nie ma informacji na temat przedziałów istotności przez nie określanych. Ani w opisie statystyki ani przy opisach Rycin nie podano liczby powtórzeń wykonanych doświadczeń.

Uzyskane wyniki przedstawiono na 31 stronach i 23, często złożonych, Rycinach.

Do tej części Rozprawy mam kilka uwag i komentarzy.

1. Podstawowymi parametrami oznaczanymi jako pierwsze w pomiarach cytometrycznych, na podstawie których zaznacza się badaną populację komórek a odrzuca fragmenty komórek i tzw. „debris" są wielkość (FSC) i ziarnistość (SSC), pokazywane na dot plotach jako zależność parametrów FSC od SSC. Wykres wielkości i ziarnistości pozwala także na odrzucenie dubletów komórkowych z analizy. Wykresy FSC/SSC powinny zostać pokazane w przykładowych eksperymentach opisanych w rozprawie. Czy mogę poprosić o pokazanie wykresów FSC/SSC, chociażby dla przykładowego eksperymentu z PHA i geldanamycyną?

2. Nie do końca zgadzam się z interpretacją wyników dotyczących wpływu geldanamycyny na cykl komórkowy w przypadku komórek prawidłowych traktowanych PHA, przedstawioną przez doktorantkę w Streszczeniu (str. 3) i potem w Dyskusji (str. 52 i Rycina 30). Doktorantka pisze, ze geldanamycyna indukuje przejście komórek do fazy G0 cyklu komórkowego („induces transition of cells to the G0 state of cel cycle"), w przypadku komórek prawidłowych stymulowanych do proliferacji PHA. Według mnie, geldanamycyna, w zależności od stężenia, raczej uniemożliwia wyjście z G0 i wejście w cykl komórkowy pod wpływem PHA (przed podaniem PHA gros limfocytów nie proliferuje i znajduje się w stanie „resting" - 88% w G0 i 11% w G1 – według wyników pokazanych na Rycinie 7A). Zresztą taka interpretacja autorki znalazła się na stronie 23 („geldanamycine inhibits the cel cycle traverse ....by blocking the recruitment of cells from G0 into the cel cycle") oraz później, jako wniosek z doświadczeń z różnym schematem czasowym podawania PHA i geldanamycyny. Efekt ten oczywiście nie był widoczny w przypadku komórek Jurkat, które jako komórki nowotworowe, proliferuja i znajdują się w cyklu komórkowym. W związku z tym, że obie interpretacje przeplatają się w rozprawie, prosiłabym o odniesienie się do tej kwestii i przedstawienie klarownej opinii w czasie obrony.

2. Mylące, choć oczywiście matematycznie prawidłowe, jest według mnie przedstawianie wyników jako względny wzrost procentowy (np. wzrost o 66-70% -str. 25, opis do Ryciny 11D). Poprawniej byłoby w mojej opinii opisywanie bezwzględnej wartości odsetków (czyli wzrost z około 8% do 13% - wartości odczytane przeze mnie z przedstawionego grafu- ta sama Rycina). Takie przedstawienie lepiej przedstawia czytelnikowi zakres i wielkość zmian w obrębie poszczególnych faz cyklu komórkowego, i jest bliżej surowych danych.

3. W pracy przedstawiono odsetki populacji subG1 i populację tę określano jako apoptotyczną. Czy doktorantka badała także ogólną śmiertelność komórek w teście usuwania jodku propidyny (PI) lub innych tzw. „viability dyes". Wynik taki dalby przesłanki o wpływie geldanamycyny na śmiertelność komórek także poprzez inne mechanizmy, nie tylko klasyczną apoptozę prowadzącą do typowej fragmentacji DNA (subG1).

4. Na jakiej podstawie doktorantka twierdzi, że NFκB pośredniczy w apoptozie indukowanej przez geldanamycynę (Streszczenie)? W mojej opinii zastosowanie zmutowanych komórek Jurkat z nieaktywną formą NFκB lub inhibitora NFκB nie pozwala na wysnucie takiego wniosku. Prawdziwsza, według mnie, jest interpretacja przedstawiona przez autorkę na początku Dyskusji, że zahamowanie NFκB potęguje pro-apoptotyczny efekt geldanamycyny.

5. W końcu, chciałabym podkreślić bardzo ciekawe, różniące się detalami eksperymenty dodatkowe pokazane na Rycinach 28 i 29, które pozwoliły ostatecznie potwierdzić uzyskane wcześniej wyniki dotyczące wpływu geldanamycyny na cykl komórkowy.

Dyskusja jest krótka i dobrze napisana. Doktorantka dyskutuje uzyskane wyniki na tle dostępnej literatury, przedstawiając na schematach także potencjalne mechanizmy obserwowanych zmian zachodzących pod wpływem geldanamycyny. Na podkreślenie zasługuje ciekawa hipoteza „HSP90 addiction", przedstawiona na Rycinie 32, która podkreśla znaczenie uzyskanych w tej rozprawie wyników. W dyskusji pojawia się także wątek potencjalnego mechanizmu i wpływu HSP90 na ekspresję poszczególnych cyklin, a przez to na regulację cyklu komórkowego (Schemat na Rycinie 31) . Oczywiście szkoda, ze autorka nie próbowała eksperymentalnie wyjaśnić chociaż częściowo mechanizmu działania geldanamycyny na regulatory cyklu komórkowego w używanym modelu komórkowym, co znacznie wzbogaciłoby pracę o wyniki pozwalające wejrzeć trochę w mechanizm obserwowanych zmian. Ale dobrze, że dyskutuje te kwestie.

Korzystając z okazji do spotkania z doktorantką, oprócz wcześniej wymienionych zagadnień, prosiłabym jeszcze o zwięzłe odniesienie się do poniższych kwestii:

- Jak w świetle wyników uzyskanych na prawidłowych komórkach krwi (wpływ na G0/G1) ocenia Pani ewentualny wpływ geldanamycyny na komórki macierzyste/quiescent i różnicowanie macierzystych komórek krwiotwórczych.

- Wiele współczesnych danych wskazuje, że zahamowanie NFκB, w tym także przez geldanamycynę, wpływa na proces autofagii, nie tylko na apoptozę. Ponieważ oba procesy istotnie regulują przeżywalność komórek nowotworowych, może to mieć znaczenie dla prowadzonych przez autorkę badań a także potencjalnego zastosowania geldanamycyny w terapii przeciwnowotworowej. Niestety w Dyskusji nie znalazł się ten wątek, dlatego prosiłabym teraz o krótkie odniesienie się do tego zagadnienia.

- Czy doktorantka orientuje się, czy wśród badań klinicznych dotyczących zastosowania geldanamycyny w terapii przeciwnowotworowej są takie, które dotyczą białaczek?

Wniosek końcowy

Przedstawione powyżej uwagi i komentarze, których część wynika z mojej ciekawości, nie wpływają na końcową pozytywną ocenę niniejszej rozprawy. Doktorantce udało się zrealizować założone cele i uzyskać interesujące wyniki, które mimo że nie wyjaśniają mechanizmu obserwowanych zmian, przyczyniają się do wskazania geldanamycyny jako interesującego związku u dużym potencjale klinicznym i jasno wskazują na zasadność prowadzenia dalszych prac w tym kierunku. Należy docenić wysokiej klasy ekspertyzę pani Kajstury w dziedzinie cytometrii przepływowej oraz sprawne posługiwanie się licznymi testami cytometrycznymi.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa spełnia wszelkie wymogi stawiane pracom doktorskim, jak i warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Małgorzaty Kajstury do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 01.10.2018

Dr hab. Katarzyna Piwocka, prof. nadzw.

