



nencki institute
of experimental biology

POLISH ACADEMY OF SCIENCES

NENCKI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL BIOLOGY

Pasteur 3, 02-093 Warsaw, Poland

Phone: (48-22) 659 85 71; Fax: (48-22) 822 53 42

E-mail: sekretariat@nencki.gov.pl; <http://www.nencki.gov.pl>

Prof. dr hab. Ewa Sikora

Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia

Recenzja pracy doktorskiej pani mgr Pauliny Tokarz pt. „**DNA damage response induced by oxidative stress in G0 cells and that re-initiated the cel cycle**” wykonanej pod kierunkiem pana prof. dr hab. Janusza Błasiaka na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Warszawskiego.

Praca doktorska wykonana przez panią mgr Paulinę Tokarz dotyczy bardzo ciekawego zagadnienia, mianowicie indukcji i naprawy DNA przez komórki będące poza cyklem komórkowym, czyli w fazie tak zwanej G0. Praca została wykonana w bardzo dobrym ośrodku, pod kierunkiem prof. Janusza Błasiaka, który jest wybitnym ekspertem w dziedzinie uszkodzeń DNA i biologii nowotworów .

Odpowiedź na uszkodzenia DNA (ang. DNA damage response) stanowi mechanistyczną część punktów kontroli (checkpoints) wszystkich poza mitozą faz cyklu komórkowego i jest kluczowa dla prawidłowego funkcjonowania komórek, które są bez przerwy narażone na różnego rodzaju uszkodzenia DNA, w tym oksydacyjne. Stanowi też podstawowy mechanizm chroniący komórkę przed transformacją nowotworową. Komórki nowotworowe, na skutek różnego rodzaju mutacji mają często upośledzone mechanizmy odpowiedzialne za DDR, w tym naprawy DNA, i wymykają się spod kontroli podziałów. „Wyprowadzenie” komórek nowotworowych poza cykl komórkowy może być skutkiem działania terapii przeciwnowotworowej i dlatego poznanie mechanizmów reakcji komórki będącej w fazie G0 na stres oksydacyjny jest tak ważne z punktu widzenia strategii leczenia choroby nowotworowej.

Jako modele badawcze Doktorantka wybrała dwa rodzaje komórek nowotworowych, komórki HL-60 pochodzenia mieloidalnego i komórki MCF-7 pochodzenia nabłonkowego. Komórki HL-60 w celu zatrzymania proliferacji i wyjścia z cyklu komórkowego traktowane były przez 72 godz. metabolitem kwasu retinowego (ATRA), a komórki MCF-7 antyestrogenem, ICI. Te ostatnie wyprowadzano ze stanu spoczynkowe poprzez traktowanie 17β -estradiolem. Stres oksydacyjny w tych pierwszych indukowany był przy pomocy tBH, a tych drugich poprzez traktowanie nadtlenkiem wodoru lub oksydazą glukozy generującą nadtlenek wodoru, GOx bądź bleomycyną. W komórkach badano przeżywalność przy pomocy testu wyłączania błękitu trypanu oraz zestawu na przeżywalność -Muse Count Viability kit. Poziom RFT w komórkach badano z zastosowaniem sondy fluorescencyjnej H2DCF-DA i spektrofotometru, ilość DNA przy pomocy cytometru przepływowego LSRII, poziom uszkodzeń DNA przy pomocy testu kometki i odpowiedniego zestawu do analizy, autofagię (Muse Autophagy LC-3-antibody based kit) i apoptozę (MuseAnnexin V&Dead Cell kit) z wykorzystaniem analizatora komórkowego Muse firmy Millipore.

Wyniki zawierają osiem rycin, które stanowią graficzną analizę danych w postaci słupków oraz kilka danych surowych możemy znaleźć w załączonym suplemencie.

Rycina 13 i pierwsza w Wynikach przedstawia rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego oraz ich przeżywalność. Jest więc dość krytyczna dla całej pracy, gdyż pokazuje jak efektywne jest „wyprowadzanie” komórek poza cykl komórkowy. Otóż, wydaje się, że Doktorantce udało się zatrzymać prawie wszystkie komórki MCF-7 w fazie G0/G1 i potem z pełnym sukcesem „wprowadzić” je ponownie w cykl. Natomiast w przypadku komórek HL-60 sukces jest tylko częściowy, gdyż po traktowaniu ich metabolitem witaminy A (ATRA) zaledwie kilkanaście procent więcej komórek znajdujemy w fazie G0/G1 niż przed traktowaniem. Nie znalazłam komentarza na temat tej niskiej wydajności wprowadzania komórek HL-60 w stan spoczynkowy ani w rozdziale Wyniki ani w Dyskusji. Czy Doktorantka uważa, że odniosła sukces w zahamowaniu proliferacji, bo wynik jest znamieny statystycznie, czy może jednak tego sukcesu nie ma? Ustawienie modelu badań jest podstawą do dalszych działań i nie rozumiem czemu Doktorantka nie poświęciła temu więcej uwagi? Analiza cytometryczna pokazuje nam tylko ilość DNA, a więc nie rozróżnia fazy cyklu G1 od fazy poza cyklem, czyli G0. Czemu nie zostały przeprowadzone inne analizy, które jednoznacznie wykazałyby, że chociaż ta niewielka część komórek po traktowaniu ATRA jest poza cyklem komórkowym? Kiedy sami dokonywaliśmy różnicowania komórek HL-60 przy pomocy kalcitrolu, to po pierwsze prawie cała ich

populacja była zatrzymana w fazie G1/G0, a po drugie sprawdziliśmy na nich markery monocytarne, które są doskonałym znacznikiem ich różnicowania. Odsyłam Doktorantkę do pracy Mosieniak i współ z roku 2006. ATRA powinien różnicować komórki HL-60 do granulocytów, które mają też swoje markery.

Innym niezwykle prostym w oznaczeniu i skutecznym znacznikiem komórek poza cyklem, który można było zastosować w przypadku obu linii, jest poziom białka Ki67. Nie występuje ono w komórkach nie będących w cyklu, natomiast bardzo pięknie znakuje komórki we wszystkich fazach cyklu komórkowego. Wybierając sposób zatrzymania komórek w stanie spoczynkowym lub ich różnicowania Doktoranka oparła się na danych literaturowych, jednakże to nie wystarczy. Po pierwsze są one kontrowersyjne (polemizowałabym, czy inhibitor kinaz cyklino-zależnych, p21 jest dobrym znacznikiem fazy G0), a po drugie zawsze należy sprawdzić jak dany system działa w naszych rękach.

Doktoranka stosuje konsekwentnie określenia dla badanych komórek jako: proliferacja, G0 i re-inicjacja.

Przeżywalność komórek mierzono testem wyłączenia trypanu błękitu. Wynosi ona praktycznie 100%. Ciekawa jestem uzasadnienia wyboru przez Doktorantkę tego testu. Zwłaszcza że nie we wszystkich pomiarach był on stosowany?

Rycina 14 a druga rozdziału Wyniki, pokazuje wewnątrzkomórkowy poziom RFT w komórkach proliferujących, z blokadą proliferacji i nieproliferujących. Wykazano, że w przypadku MCF-7 zarówno w komórkach kontrolnych jak i traktowanych nadtlaniem wodoru stan proliferacji związany jest z większym poziomem stresu oksydacyjnego (indukowanego przynajmniej nadtlaniem wodoru) niż stan braku proliferacji. Natomiast w komórkach HL-60 jest odwrotnie. Ciekawa jestem interpretacji Doktorantki tych wyników. Jak znajdujemy w opisie ryciny, niezależnie od stosowanego czynnika indukującego stres, komórki traktowano przez 30 minut, natomiast w dalszych badaniach stosowano zróżnicowane czasy dla poszczególnych czynników. Skąd te różnice w traktowaniu komórek?

Rycina 15 i jednocześnie trzecia przedstawia przeżywalność komórek po traktowaniu czynnikami indukującymi stres. Komórki badano przy pomocy testu wyłączenia trypanu lub metodą cytometrii przepływowej. Po pierwsze, czy dla każdego typu komórek stosowano oba testy, czy raczej tak jak napisano w M&M tylko w przypadku HL-60 był to błękit trypanu? Jaką metodą badano przeżywalność z zastosowaniem FACSu? Nic na ten temat nie

znalazłam w rozdziale Materials and methods. Nota bene, mam wrażenie, że Doktorantka używa w przypadku niektórych analiz zamiennie nazwy FACS i Muse, a może jednak używa różnych urządzeń? Jest to dość niejasne.

W tym przypadku ekspozycja na stres była różna w zależności od czynnika stresogennego. Ciekawa jestem czy przeżywalność mierzono zaraz po jego usunięciu czy w innym czasie? Nie ma tej informacji ani w opisie M&M ani w Wynikach. Jeśli było to zaraz po czasie działania czynnika indukującego stres, to nic dziwnego, że pomiar nie wykazał istotnego wpływu na przeżywalność komórek, który może oczywiście ujawnić się dopiero po pewnym czasie.

Rycina 16 wskazuje na wyższy poziom uszkodzeń DNA w komórkach proliferujących niż nie proliferujących. Ciekawe, że efekt ten był o wiele bardziej widoczny w komórkach HL-60, które w stanie nieproliferującym wykazywały wyższy poziom reaktywnych form tlenu niż w stanie proliferacji (rys.14). Jak to można wyjaśnić?

Rycina 18 przedstawia poziom apoptozy mierzony testem Annexyna V/ 7-AAD wskazując na wyższą wartość w komórkach proliferujących niż nie proliferujących, co nie wydaje się być niespodzianką. I w tym przypadku brakuje mi informacji w jakim czasie mierzono apoptozę. Czy bezpośrednio po czasie działania prooksydantów?

Rycina 19 przedstawia wyniki poziomu LC3-II w badanych komórkach. Jeśli są jakieś różnice pomiędzy komórkami proliferującymi i nieproliferującymi to wskazują one na nieznacznie wyższy poziom tego białka w komórkach MCF-7 nieproliferujących i traktowanych nadtlaniem wodoru lub GOx, w porównaniu z proliferującymi. Wyniki te jednak należy traktować jako bardzo wstępne, gdyż autofagia jest procesem bardzo dynamicznym i tak naprawdę, to bez pomiarów kinetyki i innych znaczników, które pokazują tak zwany „autophagic flux” trudno jest cokolwiek powiedzieć na temat tego procesu. Wzrost poziomu LC3-II może być związany zarówno z inicjacją jak i zahamowaniem autofagii. Bez dodatkowych analiz, chociażby ścieżki sygnalizacyjnej, trudno to rozstrzygnąć.

Ostatnia rycina 19 pokazuje praktyczny brak wpływu stresu oksydacyjnego na ilość DNA w komórkach w poszczególnych fazach cyklu.

Ogólnie uważam, że w pracy tej postawiono bardzo interesujące pytanie naukowe, gdyż istotnie komórki będące w cyklu komórkowym mogą inaczej reagować na stres niż komórki w fazie G0. Pomysł, aby najpierw zatrzymać komórki MCF-7 poza cyklem komórkowym

przy pomocy antyestrogenu, a potem zainicjować w nich proliferację przy pomocy estradiolu jest oryginalny i może stanowić bardzo dobry model do szukania odpowiedzi na postawione pytanie.

Praca ma klasyczny układ z pewnym wyjątkiem. Mianowicie część wyników umieszczono w suplemencie. Przypomina to, zwłaszcza rozdział Wyniki, manuskrypt szykowany do druku. Zwłaszcza, że praca napisana jest w języku angielskim. Wrażenie to pogłębia brak typowych dla doktoratu ilustracji przybliżających badane komórki, jak chociażby ich mikroskopowej wizualizacji w różnych warunkach eksperymentalnych. Ciekawa jestem, czy Doktorantka w ogóle patrzyła na swój obiekt badawczy częściej niż tylko przy okazji testu wyłączania błękitu trypanu? Czy podglądała jak one umierają? Szczególnie interesujące jest to w przypadku komórek MCF-7, które nie mają kaspazy-3 i brak jest w ich przypadku klasycznej apoptozy.

Dość obszerny jest Wstęp, który dostarcza podstawowych informacji na temat badanych procesów. Podoba mi się Dyskusja, w której Doktorantka krytycznie podchodzi do uzyskanych wyników i omawia je na tle danych literaturowych. Dużo jest w Dyskusji odniesień do mechanizmów molekularnych badanych zjawisk, czego trochę brakuje mi w tej dysertacji, podobnie jak wizualizacji komórek. Słupki stanowią kompilacje i analizując je łatwo dokonać porównań, ale nie dają tyle radości co widok komórki pod mikroskopem (zwłaszcza umierającej lub przechodzącej autofagię), czy też profil białek ścieżki sygnalizacyjnej oglądany na kliszy. Nawiasem mówiąc, żałuję, że Doktorantka nie zapoznała się z naszą pracą (Korwek i in, DNA Repair, 2012), która właśnie dotyczy ścieżki sygnalizacyjnej DDR w spoczynkowych limfocytach.

Trzeba jednak przyznać, że za tymi słupkami kryje się wbrew pozorom bardzo dużo pracy, gdyż Doktorantka badała wiele parametrów w wielu wariantach traktowania komórek i musiała dokonać przynajmniej trzykrotnego pomiaru każdej wartości. Sam test kometkowy jest niezwykle czasochłonny. Jest to więc, mimo skąpej objętości rozdziału Wyniki, bardzo duży wkład pracy, który doceniam.

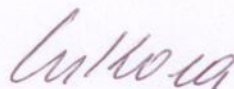
Moje uwagi krytyczne są krytyczne i mam nadzieję, że Doktorantka je weźmie pod rozwagę w swojej dalszej pracy.

Podsumowując, uważam, że jest to dobry doktorat. Doktorantka włożyła mnóstwo pracy w wykonanie wszystkich analiz i wykazała się umiejętnością stosowania wielu metod.

Otrzymała wiele interesujących wyników, które uzupełniają naszą wiedzę na temat wpływu stresu oksydacyjnego na generację i naprawę uszkodzeń w komórkach w różnych fazach aktywności proliferacyjnej.

Wnoszę do Rady wydziału Biologii i Ochrony środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o wszczęcie dalszych etapów przewodu doktorskiego pani mgr Pauliny Tokarz.

Warszawa, 23.05.16

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'C. Tokarz'.