

MARTA OLEJNICZAK, AGNIESZKA FISZER

Na pograniczu chemii i biologii – sztuka wyboru według Profesora Krzyżosiaka

Wspomnienie o Profesorze Włodzimierzu Krzyżosiaku (1949–2017)



Profesor Włodzimierz Krzyżosiak urodził się w 1949 roku w Rawiczu. W latach 1966–1971 studiował chemię na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Opolu. Studia doktoranckie odbył pod kierunkiem prof. Wiesława Antkowiaka, w Instytucie Chemii na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał w 1975 roku. Po uzyskaniu stopnia doktora habilitowanego nauk chemicznych w zakresie chemii bioorganicznej w 1984 roku, zainteresowania naukowe Profesora Krzyżosiaka zaczęły rozwijać się w kierunku biochemii

i biologii molekularnej. Miało to związek z jego licznymi stażami naukowymi w renomowanych ośrodkach badawczych w Wielkiej Brytanii, Francji, USA i Japonii. W rezultacie, w 1993 roku, nadano mu tytuł profesora biologii.

Na początku swej drogi naukowej Profesor Krzyżosiak zajmował się badaniem stereochemii glikozydów rybozy. Następnie, już w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN (ICHB PAN), nowej placówce naukowej tworzonej przez prof. Macieja Wiewiórowskiego w Poznaniu, zainteresował się badaniem nukleozydów i nukleotydydów oraz kwasów nukleinowych. W różnych aspektach badał proces oraz produkty chemicznej modyfikacji komponentów kwasów rybonukleinowych aldehydem chlorooctowym. Za cykl prac na ten temat otrzymał nagrodę naukową Wydziału Nauk Matematyczno-Fizycznych i Chemicznych PAN w roku 1981. Badania rearanżacji struktury tRNA pod wpływem chemicznej modyfikacji w odległym miejscu cząsteczki doprowadziły do zaproponowania nowej metody badań strukturalnych RNA w roztworze z wykorzystaniem

Dr hab., prof. ICHB PAN Marta Olejniczak, dr Agnieszka Fiszer – Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań

hydrolitycznych właściwości jonów metali. Metoda ta rozwijana była przez Profesora Krzyżosiaka i jego zespół przez kolejne lata w Poznaniu i z niej jest, między innymi, znany ICHB PAN w świecie.

Podczas pobytu na stażu naukowym w Instytucie Biologii Molekularnej firmy Hoffmann-La Roche w Nutley, w Stanach Zjednoczonych, w połowie lat 80., Profesor Krzyżosiak sklonował gen dużego rybosomowego RNA i przeprowadził jego wydajną transkrypcję po to, aby uzyskać funkcjonalne rybosomy z syntetycznego RNA i naturalnych białek. Osiągnięcie to otworzyło nowe możliwości badań rybosomu, a publikacja opisująca wyniki uzyskane przez Profesora cytowana była setki razy.

Kolejny staż zagraniczny Profesora w Narodowym Centrum Badań nad Rakiem w Tokio pod koniec lat 80., poszerzył zakres Jego zainteresowań o problematykę biomedyczną. Tam opanował metody biologii molekularnej, w tym metodę wykrywania mutacji w genach. Po powrocie do kraju Profesor wraz z nowym zespołem studentów Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza zainicjował w ICHB PAN dwa nurty badań – jeden związany z genetyczną predyspozycją do raka piersi oraz drugi dotyczący nietypowych mutacji sekwencji powtarzających się (tzw. sekwencji mikrosatelitarnych), prowadzących do rozwoju chorób neurologicznych. Jako kierownik Pracowni Genetyki Nowotworów, Profesor wraz zespołem odkrył w populacji polskiej nowe mutacje w genach *BRCA1* i *BRCA2*, predysponujące do raka sutka i jajnika. Należy podkreślić, że były to pierwsze badania tego typu w kraju. Kluczowym osiągnięciem było wykazanie, że ekspresja genu *BRCA1* jest regulowana na etapie translacji przez elementy strukturalne tworzone przez sekwencję Alu, co opisano w 2002 r. w publikacji wyróżnionej Nagrodą im. Jakuba Parnasa. Profesor doskonalił również metody wykrywania mutacji w genach związanych z chorobami człowieka.

W tamtym czasie jednym z wiodących tematów świata naukowego był rozwój metod sekwencjonowania i początek ery genomowej. Profesor wraz z młodym zespołem dokonał bardzo szerokiego przeglądu literatury na temat rozpoczynającego się wówczas Projektu Poznania Genomu Człowieka, co zaowocowało powstaniem książki pt. *Genom człowieka. Największe wyzwanie współczesnej genetyki i medycyny molekularnej* wydanej przez PWN.

Koniec lat 90. oraz cała następna dekada to intensywne badania nad sekwencjami mikrosatelitarnymi, które mogą podlegać ekspansji poza granice normy w różnych regionach genów. Był to zupełnie nowy typ mutacji, która obecnie jest poznana jako przyczyna kilkunastu chorób neurologicznych, m.in. dystrofii miotonicznej typu 1 i 2, choroby Huntingtona czy szeregu ataksji rdzeniowo-mózdkowych. Profesor postawił oryginalną hipotezę, że w patogenezie tych chorób dużą rolę mogą odgrywać struktury RNA, tzw. spinki RNA (ang. *hairpin*) tworzone przez powtórzone sekwencje nukleotydowe. Przez następne lata Profesor badał sekwencje mikrosatelitarne w różnych aspek-

tach, wykorzystując swoje doświadczenie w zakresie chemii strukturalnej oraz nowe metody bioinformatyki, genomiki strukturalnej i funkcjonalnej. Cykl dziesięciu prac oryginalnych z lat 2004–2006, dotyczących sekwencji powtórzonych, został wyróżniony Nagrodą Polskiego Towarzystwa Genetycznego.

Od 2005 roku Profesor wraz z zespołem brał udział w europejskim konsorcjum RIGHT (ang. *RNA Interference Technology as Human Therapeutic Tool*), w ramach którego opracowywano strategie terapeutyczne z wykorzystaniem interferencji RNA i cząsteczek siRNA (ang. *small interfering RNA*). Za odkrycie tego zjawiska Andrew Fire and Craig Mello otrzymali w 2006 roku Nagrodę Nobla. Jednym z efektów realizacji projektu RIGHT była publikacja Profesora w *Molecular Cell* z 2007 roku, nagrodzona m.in. Nagrodą im. Jakuba Parnasa. Opisano w niej nowy mechanizm działania rybonukleazy Dicer na wydłużone ciągi sekwencji powtórzonych i na tej podstawie zaproponowano strategię terapeutyczną. Za to odkrycie Profesor otrzymał również prestiżową Nagrodę Fundacji na rzecz Nauki Polskiej w dziedzinie nauk przyrodniczych i medycznych (zwaną polskim Noblem).

Profesor Jyoti Chattopadhyaya* tak wspomina początki projektu RIGHT: “When I heard his talk on siRNA, I was absolutely convinced that his contribution and observations were ground-breaking. So, when we got the large EU grant of 23 million Euro on siRNA project, I immediately, as the chair of chemistry, persuaded Dr. Thomas that we should have a Polish participant who could through his work become a solid pillar, as well as establish old eastern EU states in our science. Wlodek, again, took a leading role in that and persistently delivered quality research, very truly to Polish excellence and tradition”.

Publikacja w *Molecular Cell*, cytowana ponad 100 razy, wyznaczyła również trzy kierunki badawcze na następne intensywne dziesięć lat działania Zakładu, który został przemianowany na Zakład Biomedycyny Molekularnej. Należy podkreślić odwagę Profesora, który jako chemik z wykształcenia, jako pierwszy wprowadził do ICHB PAN badania biologiczne, wykorzystujące hodowle komórkowe oraz mysie modele chorób człowieka. Dziś, po 10 latach, biologia molekularna i genetyka stanowią niezwykle ważną i nieodłączną część Instytutu.

Pierwszy z rozwijanych w Zakładzie Biomedycyny Molekularnej kierunków badań dotyczył strukturalnych aspektów biogenezy mikroRNA (miRNA), cząsteczek kluczowych dla regulacji ekspresji genów w komórkach. W wyniku tych badań poznano sekwencyjne i strukturalne czynniki mające znaczenie dla działania rybonukleaz Dicer i Drosha. Analizy bioinformatyczne przeprowadzone na podstawie wyników głębokiego sekwencjonowania miRNA, jak również badania eksperymentalne, wykazały zarówno wpływ struk-

* Kierownik Zakładu Biologii Komórkowej i Molekularnej, Uniwersytet Uppsala, Szwecja

tury drugorzędowej, jak i sekwencji prekursora miRNA na stopień heterogenności powstających wariantów miRNA. W tej dziedzinie znaczącym osiągnięciem zespołu Profesora jest także publikacja z 2011 roku dotycząca praktycznych aspektów przewidywania miejsc wiązania miRNA, która do tej pory zyskała już ponad 300 cytowań.

Drugi wątek to poznawanie roli toksycznego transkryptu w chorobach wywołanych ekspansją powtórzeń trójnukleotydowych CAG, kodujących glutaminę (tzw. choroby poliglutaminowe). Dotychczas patogenezę tej grupy chorób wiązano jedynie z rolą toksycznego białka, natomiast Profesor jako jeden z pierwszych zaproponował rolę zmutowanego transkryptu w tym procesie. Badania te, realizowane w ramach projektu Maestro z Narodowego Centrum Nauki, doprowadziły jak dotąd do scharakteryzowania skupień jądrowych obserwowanych w komórkowych modelach chorób poliglutaminowych. Stworzono również nowe modele komórkowe i mysie kluczowe do rozróżniania efektów wywołanych przez zmutowany transkrypt i białko. Badania, prowadzone głównie z użyciem mikroskopii konfokalnej, pozwoliły na wykazanie, że tworzenie jądrowych skupień RNA i sekwestracja białka MBNL1 są charakterystyczne nie tylko dla dystrofii miotonicznej typu pierwszego (DM1), ale występuje również w różnych modelach komórkowych chorób poliglutaminowych. Stwierdzono, że obserwowane skupienia RNA lokalizują w obrębie ciałek jądrowych tzw. *nuclear speckles*. Zidentyfikowano również interakcje różnych cząsteczek miRNA z transkrypcją DMPK, zawierającym wydłużone ciągi CUG typowe dla choroby DM1. Uzyskane wyniki wskazują, że zmutowane powtórzenia mogą funkcjonować jako tzw. gąbki dla miRNA, prowadząc w konsekwencji do deregulacji genów kontrolowanych przez te miRNA.

Trzeci intensywnie rozwijany kierunek w ostatnich latach to zagadnienia związane z eksperymentalną terapią chorób poliglutaminowych, m.in. choroby Huntingtona. W nowatorskiej strategii, która była m.in. rozwijana w ramach dużego grantu strukturalnego, innowacyjnym rozwiązaniem było celowanie bezpośrednio w miejsce mutacji. Dodatkowo, w opracowywanej strategii duże wyzwanie stanowiło zapewnienie allelo-selektywności działania cząsteczek terapeutycznych, co jest związane z potrzebą zachowania ekspresji białka normalnego. Profesor wraz z zespołem opracował nowy typ cząsteczek, które łączą w sobie cechy siRNA i miRNA, co prowadzi do ich aktywności preferencyjnej dla allelu zmutowanego. Zaprojektowane cząsteczki były także wprowadzane do komórek w postaci shRNA (ang. *short hairpin RNA*), kodowanych w wektorach wirusowych w celu zapewnienia długotrwałej ekspresji. Obecnie to rozwiązanie stanowi przedmiot międzynarodowego zgłoszenia patentowego. W ramach projektu stworzono także pierwszy zhumanizowany myszy model *knock-in* ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3 (SCA3), wykazujący zmiany neurodegeneracyjne typowe dla tej choroby poliglutaminowej. Model ten posłuży nie tylko do identyfikacji nowych ścieżek patomechanizmu SCA3, ale również do testowania różnych podejść terapeutycznych *in vivo*.

Badania te są kontynuowane w konsorcjum europejskim w ramach Horyzontu 2020.

Podsumowując Profesor Włodzimierz Krzyżosiak jest współautorem ponad 130 publikacji, w tym ponad 100 prac eksperymentalnych, cytowanych ponad 3500 razy. Większość badań była realizowana siłami zespołu Profesora w ICHB PAN, a o ich wysokim poziomie naukowym świadczą prestiżowe tytuły czasopism, w których Profesor publikował: tj. *Molecular Cell*, *Nucleic Acids Research*, *PNAS*, *RNA*, *Human Mutation*, *Journal of Biological Chemistry*, *Human Molecular Genetics*.

Prowadzeni przez Profesora doktoranci uzyskiwali liczne wyróżnienia, m.in. nagrody premiera za rozprawy doktorskie oraz prestiżowe stypendia krajowe i zagraniczne. Wielu uczniów Profesora kontynuuje swoją drogę naukową w kraju i za granicą, w tym kieruje grupami badawczymi np. na Uniwersytecie Kalifornijskim w Los Angeles, Uniwersytecie Alabama w Birmingham, w Instytucie Badań Biomedycznych w Bazylei, Uniwersytecie w Edynburgu czy na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu oraz w ICHB PAN. Obszerny i znakomity dorobek naukowy Profesora istotnie przyczynił się do niezwykle dynamicznego rozwoju ICHB PAN, w tym do uzyskania statusu Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego w obszarze nauk o życiu (w 2014 r.) oraz najwyższej kategorii naukowej A+ (w 2017 r.).

O tym, co uważa za najważniejsze w pracy naukowca, Profesor Krzyżosiak pisał przy okazji otrzymania Nagrody Fundacji na rzecz Nauki Polskiej w roku 2007: „Najważniejsze w pracy naukowca są jednak, jak sądzę wybory, których sam świadomie dokonuje. Osiągając samodzielność naukową, stajemy zwykle przed dylematem: co dalej? Czy rozwijać dzieło poprzedników, czy też zacząć tworzyć coś nowego, własnego? Warto jednak wiedzieć, że w nauce tak naprawdę liczy się tylko nowatorstwo i oryginalność. Bycie nowoczesnym i nadążanie za trendami czy moda w nauce to stanowczo za mało.

Roli szkoły naukowej i mistrza nie da się przecenić. Jednak naukowcy w większym stopniu kształtują się sami, gdy podejmując nową problematykę badań, umieją odróżnić problemy ważne od mniej ważnych, oraz jeśli potrafią trafnie formułować pytania i przekonująco na nie odpowiadać dzięki dobrze zaplanowanym eksperymentom. Powinni też mieć zaufanie do współpracujących z nimi ambitnych młodych, ludzi pozwolić im na dużą samodzielność działania. To może dać niezłe efekty, czego sam jestem przykładem”.

Professor Włodzimierz Krzyżosiak (28.01.1949 – 21.12.2017)

An outstanding Polish biochemist, laureate of the Foundation for Polish Science Prize in 2007, member of the Polish Academy of Sciences, a head of the Department of Molecular Biomedicine at the Institute of Bioorganic Chemistry, PAS in Poznan

Professor Włodzimierz Krzyżosiak's research path led from the structural chemistry of nucleic acids, through molecular genetics and cancer genetics to molecular

medicine. In the last years, Professor's scientific activity focused on understanding the role of RNA in the pathogenesis of human neurological diseases caused by the expansion of repetitive sequences. He also developed new methods of experimental therapy for this group of disorders using antisense oligonucleotides and RNA interference technology. He analyzed the factors influencing the microRNA biogenesis and used this knowledge to improve RNA interference technology tools in therapeutic approaches. Overall, Professor Krzyżosiak co-authored more than 130 publications, which have been cited more than 3500 times so far.

Key words: Włodzimierz Krzyżosiak, cancer genetics, trinucleotide repeats, polyglutamine diseases, RNA interference, microRNA