

Streszczenie rozprawy doktorskiej:

**Indukcja lokalnego uszkodzenia DNA przy użyciu skupionego światła widzialnego.  
Zastosowania w badaniach naprawy DNA.**

mgr Kamil Solarczyk, Pracownia Biofizyki Komórki

promotor: prof. dr hab. Jerzy Dobrucki

Poprzez oddziaływanie różnych, endo- oraz egzogennych czynników, nić DNA poddawana jest nieustannym modyfikacjom i uszkodzeniom. Dzięki wyrafinowanym procesom naprawczym, większość z powstających uszkodzeń jest szybko usuwana. Nienaprawione uszkodzenia blokują podstawowe procesy komórkowe, takie jak replikacja DNA, a część z nich może prowadzić do powstania aberracji chromosomowych. Mechanizmy naprawy DNA, ze względu na fundamentalne znaczenie dla zachowania integralności genomu, stały się zatem w ostatnich latach przedmiotem intensywnych badań. Postęp w badaniach naprawy DNA umożliwiony został m.in. poprzez rozwój szeregu metod, pozwalających na indukcję lokalnych uszkodzeń w jądrach żywych komórek oraz obserwację zjawisk naprawy in situ, w żywych komórkach. Takie podejście, wykorzystujące zaawansowane techniki obrazowania i znakowanie fluorescencyjne, pozwala na badanie zachowania białek uczestniczących w procesach naprawczych oraz na obserwację zmian struktury chromatyny, które tym procesom towarzyszą. Najpopularniejsza obecnie grupa metod opiera się na wykorzystaniu światła laserowego do indukcji lokalnego uszkodzenia DNA i obserwacji białek fuzyjnych z metką fluorescencyjną. Jednakże, istniejące techniki posiadają szereg wad. Powodują one jednoczesne wprowadzanie bardzo licznych, letalnych uszkodzeń DNA, zaliczających się do kilku typów (np. pęknięcia nici DNA i uszkodzenia oksydacyjne). W metodach tych konieczne jest użycie egzogennych fotouczulaczy.

Celém pierwszego etapu przeprowadzonych badań było opracowanie nowej, wykorzystującej światło widzialne, techniki wprowadzania lokalnego uszkodzenia DNA. W pracy [1] pokazano, że światło laserowe z zakresu widzialnego, typowo wykorzystywane jako źródło światła w mikroskopii konfokalnej, może służyć do indukcji subletalnego, lokalnego uszkodzenia w żywych komórkach linii HeLa, bez udziału egzogennych fotouczulaczy. Poprzez detekcję immunofluorescencyjną ufosforylowanej formy histonu H2AX ( $\gamma$ H2AX) oraz szeregu czynników uczestniczących w różnych ścieżkach naprawy wykazano, że wprowadzone uszkodzenia to pojedyncze oraz podwójne pęknięcia nici DNA. Badania wykazały również, że liczba powstających uszkodzeń wzrasta wraz ze zwiększeniem całkowitej dawki światła dostarczonej do wybranego rejonu jądra komórkowego. Zaobserwowano, że indukowane uszkodzenie nie hamuje podziałów komórki, co świadczy o tym, że jest subletalne i może zostać skutecznie naprawione.

Kolejnym etapem badań, które opisane zostały w pracy [2], było wykorzystanie opracowanej metody wprowadzania lokalnego uszkodzenia DNA do badania zachowania białka XRCC1, uczestniczącego w naprawie pojedynczych pęknięć nici DNA. Przeprowadzone eksperymenty pokazały, że proces gromadzenia się białka XRCC1 w miejscu uszkodzenia przebiega dwuetapowo. W bardzo krótkim czasie po naświetlaniu wiązką laserową, zakumulowane białko jest rozłożone jednorodnie w obszarze poddanym działaniu światła. W ciągu kilku minut białko zmienia jednak swój rozkład przestrzenny, formując w miejscu naświetlanym wyraźne ogniska, zawierające bardzo wiele kopii obserwowanego czynnika naprawczego. Proces przechodzenia z formy jednorodnego rozkładu do ognisk zostaje zakończony około 5 minut po indukcji uszkodzenia. Zaobserwowano również powstawanie nielicznych ognisk poza miejscem bezpośrednio uszkodzonym. Co więcej, niektóre z tych ognisk wykazały zdolność do przemieszczania się w jądrze komórkowym na odległość kilku mikrometrów. Takie zachowanie, charakterystyczne dla ciałek jądrowych, a nie dla miejsc naprawy DNA, pozwoliło wysunąć hipotezę, że białko XRCC1 gromadzi się nie tylko w miejscu uszkodzenia DNA, ale tworzy również rodzaj ciałek stresowych. Kolejne eksperymenty przemawiają na korzyść tej hipotezy. Wykazano, że ciałka XRCC1 tworzone są również w odpowiedzi na ogólny stres komórkowy (szok cieplny) oraz, że część ciałek XRCC1 kolokalizuje z białkiem Sp100, będącym głównym składnikiem ciałek jądrowych PML. Co więcej, zaobserwowano, że białko Sp100 również gromadzi się w miejscu lokalnego uszkodzenia DNA. Ten nieznany dotąd fakt może sugerować, że to białko także uczestniczy w naprawie DNA. Obserwacje te stanowią punkt wyjścia do dalszych badań.

Podsumowując, w przygotowywanej rozprawie doktorskiej opisano nową metodę generowania lokalnego uszkodzenia DNA w żywych komórkach oraz wykazano, że metoda ta może zostać z powodzeniem zastosowana w badaniach procesów naprawy DNA. Głównymi zaletami zaproponowanego podejścia są jego szeroka dostępność oraz możliwość wprowadzenia subletalnego uszkodzenia DNA bez udziału egzogennych fotouczulaczy. Zaobserwowane, nieopisane dotąd w literaturze zachowanie białka XRCC1 w odpowiedzi na lokalne uszkodzenie DNA, jego potencjalny udział w tworzeniu ciałek stresowych oraz gromadzenie białka Sp100 w miejscu uszkodzonym nie tylko potwierdzają przydatność zaproponowanej metody, ale również stanowią istotny wkład w poznanie mechanizmów naprawy DNA.

#### Publikacje:

1. K.J. Solarczyk, M. Zarębski, J.W. Dobrucki. *Inducing local DNA damage by visible light to study chromatin repair*. DNA Repair (Amst) 11 (2012) 996-1002.
2. K.J. Solarczyk, M. Kordon, K. Berniak, J.W. Dobrucki. *Two stages of XRCC1 recruitment and two classes of XRCC1 foci formed in response to low level DNA damage induced by visible light, or stress triggered by heat shock*. DNA Repair (Amst) 37 (2016) 12-21.

14.02.2016  
14.02.2016

Uweil Blang