

Toruń, dnia 12.05.2019 r.

*dr hab. Dariusz Jan Smoliński prof. UMK
Katedra Biologii Komórkowej i Molekularnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytetu M. Kopernika w Toruniu*

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pana magistra Krzysztofa Berniaka

pt. „Dynamika białek XRCC1 i HP1 β w ogniskach naprawy DNA – badania metodą FCS”

Rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Jerzego Dobruckiego w Zakładzie Biofizyki Komórki, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Niniejszą ocenę wykonałem jako osoba powołana do funkcji recenzenta na podstawie decyzji Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii z dnia 05.04.2019 r.

Uszkodzenia jądrowego DNA powstają w jądrze komórkowym na skutek działania czynników endogennych jak i egzogennych. Procesy naprawy powstających pęknięć DNA są bardzo istotne w zapobieganiu nagromadzenia uszkodzeń prowadzących do powstawania mutacji. Zaburzenia naprawy DNA są postrzegane obecnie jako jeden z istotnych czynników prowadzących do transformacji nowotworowej. Nagromadzenie jedno- i dwuniciowych pęknięć DNA może doprowadzić również do zahamowania replikacji, transkrypcji lub śmierci komórki. Jednym z mechanizmów naprawy DNA jest naprawa bezpośrednia, polegająca na prostym odwróceniu reakcji z udziałem odpowiednich enzymów. Przerwanie wiązania fosfodiesterowego może być naprawiane na drodze ligacji, inne uszkodzenia takie jak metylacja czy etylacja zasad fosforanowych naprawiane są poprzez przeniesienie grupy alkilowej na łańcuch polipeptydowy transferazy. Jednakże tylko niewielka część uszkodzeń DNA jest naprawiana w sposób bezpośredni.

Jednym z procesów zaangażowanych w naprawę DNA w sposób pośredni jest naprawa przez wycięcie fragmentu polinukleotydowego i ponowna synteza z udziałem polimerazy DNA. Jedną z podstawowych dróg naprawy uszkodzonego DNA na drodze pośredniej jest szlak naprawy poprzez wycinanie zasad (Base Excision Repair, BER). Do naprawy uszkodzeń,

takich jak połączenia wewnątrz nici czy zasady z przyłączonymi grupami chemicznymi, wykorzystywany jest szlak NER przez wycięcie nukleotydów (Nucleotide Excision Repair, NER). Jest to proces podobny do naprawy BER, lecz nie poprzedza go selektywne wycinanie zasad. W ścieżce NER usuwany jest nie tylko uszkodzony nukleotyd, ale cały otaczający go fragment łańcucha polinukleotydowego. Jest to jeden z najbardziej powszechnych szlaków naprawy DNA w komórkach eukariotycznych pozwalający na wszechstronne naprawy zmian strukturalnych w DNA.

Podczas pęknięć pojedynczej nici DNA (Single Strand Break, SSD) integralność chromosomu nie jest naruszona. SSB to jednak najczęściej występujące uszkodzenia DNA w komórce z częstością zachodzenia rzędu tysięcy razy w ciągu doby na komórkę. Za ich naprawę głównie odpowiada szlak zwany SSBR (Single-Strand Break Repair). Drugim zagrożeniem dla komórki są dwuniciowe pęknięcia DNA. Następuje wtedy utrata ciągłości chromosomu. W komórkach eukariotycznych występują dwa odrębne szlaki naprawy pęknięć dwuniciowych. Są to naprawa poprzez rekombinację homologiczną (Homology Recombination, HR) oraz naprawa poprzez scalanie niehomologicznych końców (Non-Homologous End Joining, NHEJ).

Od wielu lat procesy naprawy DNA stanowią obiekt intensywne badań biologów molekularnych, jednak poza identyfikacją konkretnych białek uczestniczących w procesach naprawczych, istotne jest również poznanie dynamiki tych zjawisk i ich umiejscowienie w komórce. W niniejszej rozprawie badano dwa białka jądrowe, które zaangażowane są w proces naprawy pęknięć nici DNA.

Pierwsze to jądrowe białko XRCC1 (X-ray Repair Cross Complementing Protein 1), które zaangażowane jest w ścieżki naprawy jednoniciowych uszkodzeń DNA – SSBR. Oddziałuje ono z innymi czynnikami naprawczymi (m.in. polimerazami PARP1 i PARP2, polimerazą β , kinazą/fosfatazą polinukleotydową PNKP, Ligazą I). Wcześniejsze badania wykazały, że w procesach SSBR białko XRCC1 przeważnie gromadzi się zarówno w obszarach hetero- jak i euchromatyny, ale podczas naprawy ścieżką BER XRCC1 gromadzi się wyłącznie w obszarach niezawierających heterochromatyny. Pomimo, że białko to odgrywa kluczową rolę w procesach naprawczych, nie wykazuje właściwości enzymatycznych. Inicjuje ono tworzenie ognisk naprawczych, gdzie pełni przede wszystkim funkcję strukturalną i stabilizacyjną tworząc rusztowanie dla innych białek rekrutowanych do miejsca naprawy.

Drugie badane w pracy białko bierze udział w naprawie podwójnych pęknięć DNA. Jest to Heterochromatynowe białko 1 (Heterochromatin Protein 1, HP1). Jest ono jednym z głównych składników heterochromatyny oraz istotnym czynnikiem zaangażowanym w proces

wyciszania genów ulokowanych w obrębie heterochromatyny. Różne formy HP1 są zaangażowane w wiele procesów jądrowych, w tym remodeling chromatyny, replikację ale również właśnie naprawę podwójnych pęknięć DNA. Podobnie jak XRCC1 białko HP1 również gromadzi się w rejonach wokół uszkodzonego DNA.

Problematyka badawcza podjęta przez doktoranta jest oryginalna, ciekawa i dotyka zagadnień będących w centrum zainteresowania licznych badaczy. Celem niniejszej pracy było zbadanie ruchliwości białka XRCC1 i białka HP1 zarówno w nukleoplazmie, jak i w miejscu prowadzonej aktywnie naprawy DNA. Dodatkowo przeprowadzono analizę ruchliwości zmodyfikowanych funkcjonalnie wariantów białka XRCC1 (pozbawionych miejsc fosforylacji czy pozbawionych domen odpowiadających za oddziaływania z innymi białkami).

Do realizacji tych ambitnych celów badawczych Pan mgr Krzysztof Berniak miał do dyspozycji doskonale wyposażone laboratorium bioobrazowania na Uniwersytecie Jagiellońskim w znakomitym zespole promotora prof. Jerzego Dobruckiego, wybitnego specjalisty w zakresie obrazowania oddziaływania kompleksów DNA z białkami. Badania były prowadzone z wykorzystaniem szeregu współczesnych technik biofizycznych oraz technik biologii molekularnej. Na uznanie zasługuje także współpraca krajowa i międzynarodowa, z jakiej korzystał doktorant podczas wykonywania niniejszych badań. Muszę przyznać, że Pan mgr Krzysztof Berniak w pełni skorzystał z tych możliwości czego wynikiem jest ta dysertacja, a także 7 oryginalnych publikacji których jest współautorem.

Dynamika białek jądrowych i włókien chromatyny była badana z zastosowaniem zaawansowanych technik mikroskopii fluorescencyjnej, takich jak Spektroskopia Korelacji Fluorescencji (Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS) i utraty fluorescencji w wyniku fotobłaknięcia (Fluorescence Loss In Photobleaching, FLIP). Pomiarów te wykonano na komórkach HeLa z przejściową ekspresją fluorescencyjnych białek fuzyjnych.

Zastosowanie metody Spektroskopii Korelacji Fluorescencji (Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS) pozwoliło na wykazanie istnienia subpopulacji tych białek różniących się mobilnością. Wyniki uzyskane szczególnie z zastosowaniem techniki FCS pozwoliły oszacować współczynnik dyfuzji, stężenie czy stan agregacji badanych białek jądrowych. Pozwoliło to pośrednio na uzyskanie informacji na temat mechanizmu ich wiązania oraz roli w naprawie DNA.

Układ pracy jest zgodny z zasadami redagowania rozpraw doktorskich. Rozprawa została podzielona na standardowe w pracach biologicznych rozdziały. Dodatkowo została wzbogacona o rozdziały takie jak Kluczowe definicje, Streszczenie wyników czy rozdział

Perspektywy dalszych badań. Rozdział Streszczenie wprowadza w tematykę prowadzonych badań związanych z uszkodzeniami DNA, oraz szczegółowo przedstawia budowę i rolę białek XRCC1 i HP1. Druga część wstępu opisuje mobilność cząstek w jądrze komórkowym i bardzo szczegółowo wprowadza w metody badań zastosowane przy wykonywaniu niniejszej pracy. Rozdział poświęcony materiałowi i metodom podzielony został na podrozdziały w których szczegółowo opisane zostały metody i techniki doświadczalne zastosowane w pracy. Szczególnie wyczerpująco została omówiona metoda FCS i jej modyfikacje. Ta część rozdziału pokazuje z jak zaawansowaną badawczą techniką mamy tu do czynienia. Na pochwałę zasługuje zwrócenie również uwagi na ograniczenia metodyczne zastosowanych technik. Świadczy to o znakomitym opanowaniu warsztatu badawczego użytego przy podczas wykonywania badań przez doktoranta. Zastosowanie techniki FCS wymagało od doktoranta precyzyjnego dopracowania warunków eksperymentalnych, w badaniach prowadzonych na żywych komórkach podczas kilkudniowych testów. Takie eksperymenty wymagały wykonania wielu powtórzeń i szeregu testów „sprzętowych” aby uzyskać wyniki w standartowych warunkach. Ponadto na potrzeby eksperymentów modyfikacji poddano mikroskop konfokalny Leica TCS SP5. W celu przeprowadzenia pomiarów opracowano optymalne procedury pomiarowe. Przeprowadzono równoległe testy sprawdzające aby upewnić się co do powtarzalności i poprawności uzyskanych wyników. Na potrzeby tych badań Autor napisał specjalny algorytm do obróbki i analizy danych uzyskanych metodą FCS. Zarówno wstęp jak i materiał i metody ilustrowane są fotografiami, tabelami i rycinami dobrze obrazującymi i uzupełniającymi treści zawarte w tych rozdziałach.

Najobszerniejszą część rozprawy stanowi opis wyników badań. Wszystkie wyniki zostały opisane niezwykle szczegółowo, świetnie zilustrowane starannie przygotowanymi wykresami, tabelami i wysokiej jakości dokumentacją fotograficzną. Tak wyczerpująca prezentacja uzyskanych wyników nie zdarza się często i zasługuje na uznanie.

Do najważniejszych wyników pracy należy zaliczyć:

- Wykazanie, że również poza miejscami naprawy na terenie nukleoplazmy część populacji białka XRCC1 występuje w formie związanej.
- Wykazanie, że białko XRCC1 pozbawione domeny BRCT1 odpowiadającej za wiązanie się tego białka z białkami naprawczymi wykazuje wyższą mobilność w porównaniu do białka XRCC1 o prawidłowej strukturze.
- Stwierdzenie, że po pozbawieniu białka XRCC1 domeny BRCT2 odpowiedzialnej za jego gromadzenie w miejscu uszkodzenia DNA i za oddziaływania z innymi białkami jądrowymi, podnosi się jego ruchliwość w nukleoplazmie. Jego mobilność jednak nie

osiąga poziomu jaki obserwowano w cytoplazmie kiedy to białko nie wykazuje oddziaływań z innymi partnerami. Ponadto zaobserwowano spadek ilości białka poruszającego się wolniej.

- Wyniki doświadczenia z dezaktywacją miejsc fosforylacji, wskazują na brak wpływu tych modyfikacji potranslacyjnych na zdolność do gromadzenia się XRCC1 w obszarze prowadzonej naprawy, oraz na jego zmiany jego mobilności zarówno w nukleoplazmie jak i ognisku naprawy DNA.
- Wykazanie istnienia trzech subpopulacji białka HP1 znacznie różniących się mobilnością w ognisku naprawczym po dopasowaniu do uzyskanych krzywych FCS trójskładowego modelu dyfuzji dla tego przypadku.
- Obserwacja, że w obszarze naprawy część cząsteczek obu białek porusza się wolniej niż nie uszkodzona chromatyna.

Czytając rozdział Wyniki zastanawiałem się dlaczego pewne doświadczenia które wydawały się w zasięgu i które jeszcze bardziej uwiarygodniłyby wyniki badań Autora nie zostały wykonane. Większość odpowiedzi na moje wątpliwości częściowo odnalazłem już w rozdziale Dyskusja, a częściowo w rozdziale Perspektywy dalszych badań. Zauważone przeze mnie „braki” wynikały często jak się okazało z trudności technicznych w warunkach eksperymentu, a częściowo były też znane Autorowi dysertacji a wymagają „tylko” jeszcze przeprowadzenia dodatkowych eksperymentów. Jest to również jednym z powodów mojej bardzo wysokiej oceny prezentowanej pracy doktorskiej.

Ostatnie rozdziały rozprawy to głównie dyskusja wyników uzyskanych w pracy w odniesieniu do aktualnej literatury. W takim ujęciu wyniki są dobrze omówione i skonfrontowane z aktualnym stanem wiedzy. Tym łatwiej czyta się dyskusję, że już w rozdziale opisującym wyniki Autor wstępnie dyskutował swoje wyniki z literaturą.

Bardzo wysoko oceniając uzyskane wyniki, mam kilka uwag/pytań, które są bardziej komentarzami niż zastrzeżeniami:

- Czy nie zasadniejsze było by umieszczenie w tytule nazwy całej rodziny białek HP1 zamiast tylko jednego jego paralogu HP1 β ? W pracy badano również ruchliwość białek HP1 α i HP1 γ co prawda tylko na terenie nukleoplazmy, ale z przedstawionych danych wydaje się że wszystkie białka HP1 wykazują w jądrze podobną ruchliwość.

- Wydaje mi się, że na tym etapie badań nie ma żadnych podstaw aby stawiać hipotezę, że zmutowane białko z błędnym zwinięciem domeny BRTC1 w białku XRCC1 może

niespecyficznie oddziaływać z innymi białkami jądrowymi. Aby to potwierdzić trzeba by wykonać np. analizę IP Mass spec. Wydaje mi się, że na tą chwilę wolniejszą dyfuzję tego białka bezpieczniej tłumaczyć tak jak też zostało to przez Autora zaproponowane zwiększeniem promienia hydrodynamicznego tego białka.

- Z danych literaturowych wynika, że HP1 wykazuje specyficzne wiązanie do heterochromatyny inne niż wiązanie w uszkodzonym obszarze chromatyny. Wydaje się, że warto odnieść wyniki dynamiki mobilności w ogniskach naprawy do typów chromatyny. W dyskusji Autor przedstawił jako główną trudność w tego typu analizie obecność w komórkach HeLa jedynie małych drobnych skupień heterochromatyny. Czy planowana jest w przyszłości dla lepszego zrozumienia tych oddziaływań próba przeprowadzenia takiej analizy w innych komórkach ssaków np. w komórkach gryzoni, które posiadają dobrze uorganizowane chromocentra?

- Pojawienie się w wynikach badań trzeciej populacji białka HP1 w ogniskach naprawczych o ruchliwości znacznie mniejszej nawet niż chromatyna, było tłumaczone w pracy hipotezą o udziale tego białka w usztywnieniu chromatyny w trakcie naprawy. W dyskusji Autor wspomniał, że prowadzi obecnie dalsze badania w celu potwierdzenia tej hipotezy jak przypuszczam z użyciem techniki FCS czy FCCS i np. układu badawczego z transfekcją HP1 eGFP i H2B mRFP, H2A mRFP czy może H3RFP670 co wynikałoby to z kolei z informacji w rozdziale Perspektywy dalszych badań. Czy są już może jakieś nowe dane które potwierdziły by tą interesującą hipotezę?

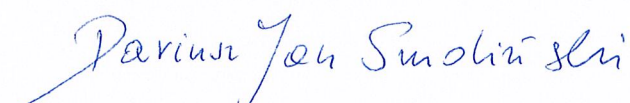
- W doświadczeniach z wykorzystaniem przejściowej ekspresji białek fuzyjnych w komórkach z ekspresją białek endogennymi dodajemy dodatkową egzogenną pulę białek. Można spodziewać się, że całkowita ilość białka jest znacznie wyższa niż w normalnych komórkach tym bardziej, że zastosowano tu nie endogenne a silne promotory w plazmidach. Może to wpłynąć na wysycenie miejsc wiązania i prawdopodobnie wpłynie na zaburzenie proporcji między pulą związaną a niezwiązaną. Wydaje się, że dość istotne było by oszacowanie tej zmiany. W dyskusji podjęto rozważania na ten temat tłumacząc, że w doświadczeniu z użyciem przejściowej ekspresji nie jest możliwe oszacowanie stosunku ilościowego białka fuzyjnego do endogennego metodą np. Western blot. Czy jednak nie można by zastosować metody immunofluorescencyjnej z użyciem przeciwciał do białka HP1 wykrywającego obie populacje białek HP1 i przeciwciał do domeny eGFP białek fuzyjnych. Nie mam tu na myśli analizy i zbadania metoda immunofluorescencyjną tej samej komórki

wykorzystanej w badaniach FCS (co byłoby pewnie nie możliwe), ale oszacowania tego stosunku w całej populacji komórek z różnym poziomem ekspresji przejściowej HP1-eGFP.

- Czy były wykonywane próby określenia w jakiej fazie cyklu są badane komórki G1, S czy G2, zarówno ze względu na proces replikacji podczas fazy S jak też różną ilość DNA w G1 i G2? Co prawda wyniki uzyskane w pracy wydają się być dość jednorodne w poszczególnych eksperymentach, poproszę jednak doktoranta aby podczas obrony odniósł się do mojego pytania.

Podsumowując, rozprawa doktorska Pana mgr Krzysztofa Berniaka zawiera ważne i oryginalne wyniki, świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu doktoranta do prowadzenia badań. Wyszczególnione drobne uwagi wynikają z obowiązku recenzenta i nie mają one wielkiego wpływu na wysoka ocenę pracy.

W podsumowaniu, na podstawie dokonanej wysoce pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej, stwierdzam, że recenzowana praca spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim i wnioskuję do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii o dopuszczenie Pana mgr Krzysztofa Berniaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na oryginalność i wysoką wartość naukową wyników wnoszącą do istniejącej wiedzy ważne fakty, pozwalam sobie złożyć wniosek do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii o wyróżnienie tej rozprawy stosowną nagrodą.


dr hab. Dariusz Jan Smoliński, prof. UMK