

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki
Zakład Biofizyki
Instytut Fizyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
W Lublinie

Lublin, 25 kwietnia 2013 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Dominiki Trembeckiej-Lucas
pt. „Heterochromatin Protein (HP1) dimer and Proliferating Cell Nuclear Antigen
(PCNA) interact in DNA replication and repair”**

Temat pracy doktorskiej mgr Dominiki Trembeckiej-Lucas, tak jak i główny wynik rozprawy, zawarte są już w samym tytule, który ma formę jednoznacznego stwierdzenia, iż dimer obecnego w heterochromatynie białka HP1 nie tylko kolokalizuje się ale i oddziałuje z antygenem PCNA w jądrach komórkowych, w miejscach replikacji i naprawy DNA. Wynik taki jest w moim odczuciu zdecydowanie interesujący oraz ważny. Jego siła wypływa z faktu odkrycia, że oddziaływanie HP1-PCNA jest istotne z fizjologicznego punktu widzenia jako uczestniczące w replikacji i naprawie DNA ale również z faktu, że przeprowadzone i zawarte w rozprawie badania są na tyle zaawansowane oraz precyzyjne a ich wyniki jednoznaczne, iż faktycznie uzasadniają moc takiego stwierdzenia.

Przedłożona rozprawa doktorska opiera się na dwóch publikacjach ogłoszonych w renomowanych czasopismach specjalistycznych:

1. D.O. Trembecka-Lucas and J.W. Dobrucki, „A heterochromatin protein 1 (HP1) dimer and a proliferating cell nuclear antigen (PCNA) protein interact in vivo and

Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

pl. Marii Curie-Skłodowskiej 1
20-031 Lublin
tel. (81) 537 62 50
fax (81) 537 61 91
e-mail: info@biofizyka.umcs.lublin.pl



are parts of a multiprotein complex involved in DNA replication and DNA repair”, *Cell Cycle* 11 (2012) 2170-2175.

2. D.O. Trembecka-Lucas, A.T. Szczurek and J.W. Dobrucki, “Dynamics of the HP1 β -PCNA-containing complexes in DNA replication and repair”, *Nucleus* 4 (2013) 74-82.

Obydwa czasopisma wybrane do ogłoszenia uzyskanych wyników badań, w szczególności zaś „Cell Cycle”, należą do kategorii czołowych w obszarze biologii molekularnej jądra komórkowego oraz cieszą się bardzo dobrą reputacją wśród specjalistów, czego wyrazem może być stosunkowo wysoki poziom współczynnika Impact Factor (*Cell Cycle*, IF>5). Przeczytałem obydwie prace z dużym zainteresowaniem. Zredagowane zostały one w sposób bardzo klarowny, precyzyjnym językiem, z wyraźną dbałością o ilustrację graficzną wyników badań przytaczanych na poparcie stawianych tez. Obydwie prace opierają się na precyzyjnej oraz bardzo eleganckiej analizie mikroskopowej znakowanych fluorescencyjnie białek HP1 oraz PCNA w jądrach komórek HeLa. W badaniach zastosowano zaawansowane warianty analizy opartej na mikroskopii fluorescencyjnej. W pierwszej z prac wykorzystano technikę określaną jako BiFC (bimolecular fluorescence complementation) w celu wykazania tworzenia kompleksów HP1 β -PCNA. W eksperymentach tych rolę niefluoryzujących komponentów, którymi wyznakowane zostały HP1 β oraz PCNA, stanowiły fragmenty białka fluoryzującego YFP. Utworzenie kompleksu HP1 β -PCNA umożliwiło również asocjację podjednostek znacznika oraz odzyskanie jego zdolności do emisji fluorescencji. Umożliwiło to precyzyjną lokalizację mikroskopową miejsc tworzenia kompleksów HP1 β -PCNA w komórce. Wyniki badań wskazały, iż kompleks taki formowany jest w miejscach replikacji DNA oraz naprawy uszkodzeń indukowanych intensywną wiązką lasera o długości fali emisji 405 nm. Drugim z wykorzystanych podejść, które w mojej ocenie jest również bardzo precyzyjne oraz eleganckie, było tak zwane FRET-FLIM (Förster Resonance Energy Transfer-Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy). W ramach rozprawy, podobnie zresztą jak i we współczesnym piśmiennictwie, skrót FRET tłumaczony bywa na dwa sposoby, jako Förster albo Fluorescence resonance energy transfer, z czego osobiście bliższe jest mi to pierwsze, ze względu na precyzję sformułowania, ponieważ to nie fluorescencja ale energia wzbudzenia elektronowego podlega przekazowi zgodnie z mechanizmem Förstera.



W celu analizy formowania kompleksów, PCNA wyznakowane zostało białkiem fluorescencyjnym GFP zaś HP1 β znacznikiem mCherry. Precyzyjny dobór znaczników, ze względu na wzajemne położenie pasm absorpcji światła oraz fluorescencji na skali energii, umożliwiał wydajny transfer wzbudzenia elektronowego, pod warunkiem bliskiej odległości donora energii (GFP) oraz akceptora (mCherry). Transfer taki obserwowany być może bezpośrednio poprzez zmniejszenie intensywności emisji fluorescencji donora oraz wzrost intensywności emisji fluorescencji akceptora, w warunkach selektywnego wzbudzania donora lub też na drodze analizy czasów zaniku fluorescencji donora, który w warunkach przekazu wzbudzeń ulega skróceniu. To właśnie podejście, połączone z obrazowaniem czasów życia fluorescencji w żywych komórkach, zastosowane zostało w drugiej z prac składających się na rozprawę doktorską. Przeprowadzone w oparciu o tę technikę analizy potwierdziły jednoznacznie formowanie kompleksów białkowych HP1 β -PCNA w miejscach replikacji oraz naprawy DNA. W drugiej z prac przedstawiono ponadto analizę mobilności kompleksów HP1 β -PCNA w oparciu o podejście określane jako FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching). Wyniki tych analiz pokazały, iż w warunkach nie związanych z replikacją oraz naprawą DNA ruchliwość kompleksu jest wysoka i zbliżona do ruchliwości innych białek obecnych w cytoplazmie podczas gdy w warunkach związanych z replikacją kompleks HP1 β -PCNA jest związany i nie obserwuje się jego dynamicznej dyfuzji. W moim odczuciu jest to bardzo ważny wynik na poparcie tezy o udziale kompleksu HP1 β -PCNA w mechanizmie replikacji oraz naprawy DNA, tym bardziej, iż wynik ten opiera się na wyjątkowo bogatej analizie statystycznej obserwowanych procesów.

Prezentacja artykułów oryginalnych, na których opiera się rozprawa doktorska, poprzedzona została wstępem w języku angielskim oraz polskim zatytułowanym „Tło i opis przeprowadzonych badań”. Również ta część, wprowadzająca w tematykę rozprawy, zredagowana została w sposób bardzo przejrzysty, z dbałością o precyzję sformułowań oraz estetykę szaty graficznej. Tekst ten czyta się z przyjemnością i okazuje się on bardzo cenny w przypadku gdy znane i bliskie są stosowane w ramach rozprawy techniki badawcze ale niezbyt może szczegółowo problemy związane z replikacją DNA. Czytający odnieść może satysfakcję z poznania tego ważnego i interesującego obszaru badań. Prezentowane wyniki pobudzać mogą również



ciekawość poznawczą. Wyrazem tego może być, na przykład, pytanie, czy na podstawie otrzymanych wyników FRET możliwe byłoby oszacowanie odległości fluoroforów cząsteczek donora i akceptora w kompleksie?

Formułując konkluzję, chciałbym jednoznacznie stwierdzić, iż w mojej ocenie poziom przeprowadzonych przez mgr Dominikę Trembecką-Lucas badań naukowych, w ramach przygotowywania rozprawy doktorskiej oraz, przede wszystkim, ich waga, w pełni odpowiadają kryteriom stawianym ustawowo pracom doktorskim. W związku z tym, uprzejmie proszę wysoką Radę Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o przyjęcie mojej rekomendacji oraz dopuszczenie mgr Dominikę Trembecką-Lucas do dalszych etapów przewodu doktorskiego. W moim odczuciu, ranga odkryć przedstawianych w ramach rozprawy czyni ją szczególnie wartościową. W związku z tym, uprzejmie proszę również o rozważenie poddania pod głosowanie wniosku o uznanie tej rozprawy doktorskiej jako wyróżniającej.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki