

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Dominiki Trembeckiej-Lucas

"Heterochromatin Protein (HP1) dimer and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) interact in DNA replication and repair"

Współczesną biologię charakteryzuje ze wszech miar słuszne dążenie do integracji wielu metod badawczych skierowanych na wyjaśnienie mechanizmów funkcjonowania komórek i narządów w warunkach podstawowych i patologicznych. W ciągu ostatnich dwóch dekad zdumiewającemu postępowi metodologii molekularnej towarzyszy nieco mniej spektakularny, ale równie istotny postęp w obrazowaniu procesów wewnątrzkomórkowych, często w warunkach *in situ*, przy pomocy nowoczesnych metod mikroskopowych. Dobitym wyrazem uznania świata nauki dla rosnącej roli metod obrazowania wykorzystywanych do analizy procesów zachodzących w komórkach w przebiegu nawet ułamka sekundy, było przyznanie nagrody Nobla w dziedzinie chemii w 2008 roku trzem badaczom, Rogerowi Y. Tsienowi, Osamu Shimomurze i Martinowi Chalfie za badania nad zielonym białkiem fluorescencyjnym (GFP). Badaniom nad mechanizmami oddziaływania białka heterochromatynowego 1 (HP1) z innymi białkami jądra komórkowego oraz nad dynamiką tych oddziaływań, przy pomocy nowoczesnych technik mikroskopowych poświęcona jest rozprawa doktorska mgr Dominiki Trembeckiej-Lucas, której promotorem jest Profesor Jerzy Dobrucki.

Regulacja podziałów komórki oraz ekspresji genów stanowią kluczowe zagadnienia współczesnej biologii komórki, których poznanie jest niezwykle ważne m.in. dla zrozumienia kontroli procesów różnicowania komórkowego i nowotworzenia. Chociaż od dość dawna wiadomo, że białka histonowe i niehistonowe stanowią ok. 1/3 suchej masy jądra komórkowego, metody ich analizy we wnętrzu *nienaruszonych* komórek nie pozwalały na uzyskiwanie tak dokładnych danych jak metody biochemiczne, które oparte są na analizie *ekstraktów komórkowych*, a więc w zasadniczy sposób odbiegających od naturalnych warunków. Postęp w zakresie współczesnych technik mikroskopowych pozwolił w ciągu ostatniej dekady na uzyskiwanie danych *in situ*, szczególnie w warunkach hodowli komórkowej, które pozwalają na weryfikację wyników badań molekularnych i

biochemicznych i, łącznie z nimi, stanowią podstawę do uzyskiwania danych niemożliwych do zdobycia bez integracji wielu metod badawczych.

W taką właśnie konwencję nowoczesnego pojmowania roli technik mikroskopowych w wyjaśnianiu tajemnic funkcjonowania komórki wpisują się prowadzone już od kilkunastu lat prace zespołu kierowanego przez Profesora Jerzego Dobruckiego, kierownika Pracowni Biofizyki Komórki na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Za jedno z ważnych ostatnich osiągnięć Zespołu należy uznać przedstawioną do oceny rozprawę doktorską mgr Dominiki Trembeckiej-Lucas.

Rozprawę pt. ***"Heterochromatin Protein (HP1) dimer and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) interact in DNA replication and repair"*** przygotowano w postaci referatu, w którym Doktorantka omówiła tematykę i główne wyniki swoich badań przedstawionych w dwóch oryginalnych pracach opublikowanych w latach 2012 - 2013.

1. D.O. Trembecka-Lucas, J.W. Dobrucki (2012) *A heterochromatin protein 1 (HP1) dimer and a proliferating cell nuclear antigen (PCNA) protein interact in vivo and are parts of a multiprotein complex involved in DNA replication and DNA repair. Cell Cycle, 11:2170-5*, wraz z dodatkowymi danymi zawartymi w suplemencie tej pracy.
2. D.O. Trembecka-Lucas, A.T. Szczurek, J.W. Dobrucki (2013) *Dynamics of the HP1-PCNA containing complexes in DNA replication and repair. Nucleus, 4:74-82*.

Rozprawa doktorska, przedstawiona w języku polskim i języku angielskim, licząca łącznie 73 strony, została opracowana w postaci dwóch głównych części. Pierwszą z nich, zawierającą 6 rycin i 87 pozycji piśmiennictwa, Doktorantka zatytułowała: "Tło i opis przeprowadzonych badań". W odniesieniu do klasycznej formy rozpraw doktorskich można ją traktować jako przedstawienie wstępu i celu badań, po których następuje opis głównych wyników i ich podsumowanie. Drugą, integralną część rozprawy, stanowią wymienione powyżej opublikowane prace doświadczalne, zawierające dokładny opis zastosowanej metodyki, przedstawienie wyników (łącznie 8 złożonych rycin i jeden film, stanowiący część suplementu pierwszej pracy) i ich dyskusja, oparta o 31 pozycji piśmiennictwa w pierwszej pracy i 43 pozycje w drugiej publikacji.

Tematyka i wyniki obydwu oryginalnych prac zawartych w rozprawie doktorskiej stanowią twórcze rozwinięcie oryginalnych obserwacji Prof. Dobruckiego i współpracowników, które wskazywały na nieopisywany wcześniej udział białka HP1 w procesie naprawy DNA wynikający z jego gromadzenia się w rejonach uszkodzeń DNA i to nie tylko w heterochromatynie, ale także w euchromatynie (M. Zarebski, E. Wiernasz, and J. W. Dobrucki (2009) *Recruitment of heterochromatin protein 1 to DNA repair sites. Cytometry A*, 75, 619-625). Ponieważ jednym z ważnych białek jądrowych tworzących kompleksy z białkiem HP1 jest białko PCNA, celem przeprowadzonych przez Doktorantkę badań była analiza nieopisanych wcześniej oddziaływań obydwu białek przy pomocy metod FRAP, FRET-FLIM oraz BiFC, także w aspekcie kinetyki tych interakcji.

Pierwsza część dysertacji zawiera omówienie podstawowych danych dotyczących białka HP1 i jego oddziaływań z histonami mających istotne znaczenie dla struktury i funkcji heterochromatyny, a także oddziaływań białka HP1 z innymi białkami jądrowymi, a szczególnie z kompleksem CAF1. Jego główny składnik, białko Caf1p150, jest bowiem bezpośrednim partnerem białka PCNA, pełniącego zasadniczą rolę w procesach replikacji i naprawy DNA. W dalszym ciągu rozprawy mgr Trembecka-Lucas omawia budowę i podstawowe funkcje białka PCNA (struktura przestrzenna trimery PCNA została przedstawiona na rycinie przygotowanej w oparciu o program PyMol), w tym jego oddziaływania z białkami jądrowymi i udział w naprawie DNA. Chociaż informacje dotyczące bardzo szerokiego tła badań można uznać za przedstawione w sposób wystarczający dla zrozumienia uzyskanych wyników i ich interpretacji, to jednak ich przedstawienie na zaledwie 7 stronach budzi u czytelnika wrażenie niedosytu poznawczego. Wydaje się, że zwięzłość opisu, tak ważna w przygotowywaniu oryginalnych publikacji, nie powinna dotyczyć wstępnej części rozprawy doktorskiej. Zdaniem recenzenta, przydatny byłby także wykaz skrótów, mimo, że zwykle wyjaśniano je przy pierwszym użyciu.

Za bardzo ważną część przedstawionej rozprawy uważam opisanie przez Doktorantkę w przystępny sposób metody uszkodzania DNA światłem widzialnym, stanowiącej oryginalne osiągnięcie zespołu Profesora Dobruckiego, w kontekście oceny interakcji badanych białek przy pomocy zastosowanych technik mikroskopowych, FRAP, FRET-FLIM oraz BiFC. Za istotną cechę zastosowanego układu badawczego należy uznać dostosowanie długości światła laserowego wywołującego uszkodzenia DNA (405 nm) do warunków emisji światła wzbudzonego

donora (YFP), co pozwoliło na uniknięcie ewentualnej utraty jego sygnału wskutek fotobłaknięcia (*photobleaching*). Dzięki takiemu układowi obserwacji mikroskopowej uniknięto też potencjalnego indukowania nowych uszkodzeń DNA w trakcie prowadzenia obserwacji jego naprawy. Drugim, bardzo istotnym elementem metodyki prowadzonych badań, było zastosowanie przez Doktorantkę techniki BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*). W rozprawie doktorskiej przedstawiono główne założenia tej techniki badawczej w postaci zwięzłego opisu uzupełnionego o ilustrację.

Zastosowanie techniki BiFC, łącznie z przeprowadzeniem transfekcji komórek HeLa plazmidami zawierającymi fragmenty białek fluorescencyjnych YFP oraz EGFP, a także mutantami białka HP1 β pozwoliło Doktorantce na wykazanie w żywych komórkach obecności w fazach G1, S i G2 cyklu komórkowego kompleksu zawierającego dimery białka HP1 oraz białko PCNA (a także, co wyraźnie zaznaczono w publikacji i rozprawie doktorskiej - prawdopodobnie także inne białka chromatyny) i powiązanie przestrzenne takich kompleksów z miejscami replikacji DNA w fazie S, przy czym replikację wykazano poprzez wykorzystanie prekursora DNA i jego uwidocznienie metodą *click-chemistry*. Wyniki te pozwoliły Doktorantce na wysnucie wniosku, że białko HP1 β pełni niepoznaną dotąd funkcję związaną z postępowaniem widełek replikacyjnych.

Innym ważnym odkryciem było wykazanie, że kompleks HP1-PCNA jest rekrutowany w komórce do miejsc uszkodzeń DNA indukowanych światłem widzialnym o długości fali leżącej poza pasmem wzbudzenia fluoroforów, które uprzednio przyłączono do białek HP1 oraz PCNA (do doświadczeń zastosowano tzw. białka fuzyjne).

Wyniki zaprezentowane w zawartej w dysertacji drugiej z opublikowanych prac doświadczalnych potwierdziły istnienie kompleksu HP1-PCNA przy pomocy dwóch niezależnych technik mikroskopowych. Mgr Trembecka-Lucas wykorzystała technikę FRAP z użyciem wolnego białka GFP do oceny dynamiki kompleksu HP1-PCNA w żywych hodowanych komórkach HeLa w przebiegu faz G1, S i G2 cyklu komórkowego oraz podczas naprawy DNA. Ustaliła, że w przeciwieństwie do ruchliwości badanych cząsteczek w jądrze komórek niereplikujących, w fazie S zarówno kompleks HP1-PCNA, jak i samo białko PCNA pozostają trwale związane w miejscach replikacji i nie ulegają dynamicznej wymianie w warunkach doświadczenia.

Doktorantka stwierdziła też inną dynamikę badanego kompleksu w miejscach uszkodzeń DNA.

Kolejna metoda badawcza, z sukcesem zastosowana przez mgr Trembecką-Lucas, tj. pomiary techniką FRET-FLIM z użyciem białek fuzyjnych GFP-PCNA (donor) i mCherry-HP1 β (akceptor), pozwoliły na potwierdzenie współwystępowania białek HP1 β i PCNA, w odległości nie większej niż 10 nm, w miejscach replikacji i naprawy DNA.

Część referatowa dysertacji zakończona jest krótkim podsumowaniem uzyskanych wyników badań, które pozwoliły na uzyskanie oryginalnych, nieopisanych wcześniej danych wskazujących na interakcję białek HP1 β i PCNA w przebiegu replikacji i naprawy DNA. W anglojęzycznej części rozprawy doktorskiej mgr Trembecka-Lucas umieściła po streszczeniu krótki podrozdział poświęcony perspektywom dalszych badań nad funkcjami białka HP1. Wskazuje tutaj na brak informacji o funkcjach paralogów HP1, które mogłyby być różne i związane np. z rolą strukturalną tych białek lub ich udziałem w replikacji i naprawie DNA. Doktorantka zauważa, że istotną kwestią wymagającą dalszych badań, w których już zaczęła uczestniczyć, jest wyjaśnienie, czy HP1 oddziałuje z kompleksem CAF-1, w tym także w procesie powstawania nukleosomów po replikacji. Mgr Trembecka-Lucas proponuje, aby do badań nad dynamiką dwóch subpopulacji HP1, z których jedną stanowi pula cząsteczek oddziałujących z histonami, a drugą białka rekrutowane do miejsc uszkodzeń DNA, zastosować metodę fluorescencyjnej spektroskopii korelacyjnej (FCS) pozwalającą na pomiar stężenia cząsteczek fluorescencyjnych w objętościach femtomolowych.

Przedstawioną do oceny rozprawę doktorską mgr Dominiki Trembeckiej-Lucas oceniam jednoznacznie pozytywnie. Podstawą tej oceny jest fakt, że dysertacja oparta jest na opublikowaniu w bardzo dobrych czasopismach międzynarodowych ściśle powiązanych ze sobą dwóch prac, w których zastosowanie kilku uzupełniających się nowoczesnych metod analizy mikroskopowej pozwoliło na scharakteryzowanie zjawiska odkrytego w zespole Promotora rozprawy, Profesora Jerzego Dobruckiego, tj. udziału białka HP1 w procesie naprawy DNA. Mimo, że we współczesnej nauce większość istotnych odkryć jest wynikiem pracy wielu osób, w przypadku ocenianej pracy doktorskiej nie ulega wątpliwości, że wspomniane

opublikowane prace zostały w części laboratoryjnej samodzielnie wykonane przez Doktorantkę, przy czym z pewnością jej udział w przygotowaniu publikacji był również znaczny. O tym ostatnim świadczy praca metodyczna z *Cytometry A* z 2010 roku, której pierwszym autorem była mgr Trembecka, a w której wnikliwie przeanalizowano wpływ różnych protokołów techniki FRAP i stwierdzono, że fotobłaknięcie jest przyczyną istotnych różnic w wynikach uzyskiwanych techniką FRAP w wielu laboratoriach, co wskazuje na konieczność przyjęcia wspólnego protokołu *photobleaching*. Mgr Trembecka jest też współautorką innej pracy metodycznej dotyczącej wykorzystania jodku propidyny do dynamicznej oceny apoptozy (*Cytometry* 2010).

Reasumując, przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Dominiki Trembeckiej-Lucas jest dowodem Jej wielkiej sprawności eksperymentalnej i intelektualnej. Znakomicie opanowała ona metody współczesnej jakościowej i ilościowej analizy przebiegu oddziaływań międzycząsteczkowych w żywych komórkach na poziomie mikroskopu konfokalnego. Oryginalne wyniki badań dotyczące nieznanych dotąd oddziaływań między ważnymi białkami jądrowymi uczestniczącymi w procesach replikacji i naprawy DNA zostały już docenione przez świat naukowy, czego dowodem jest ich opublikowanie w ważnych, liczących się specjalistycznych czasopismach międzynarodowych.

Z wielką przyjemnością stwierdzam, że przedstawiona praca w pełni spełnia kryteria rozpraw na stopień doktora nauk i zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biofizyki, Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Dominiki Trembeckiej-Lucas do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

K I E R O W N I K
Katedry i Zakładu Histologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
prof. dr hab. n. med. Zbigniew Kmiec