SKRÓT ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

„A heterochromatin protein 1 dimer (HP1) and a proliferating cell nuclear antigen (PCNA) interact in DNA replication and repair."

Doktorant: mgr Dominika Trembecka-Lucas Promotor: prof. dr hab. Jerzy Dobrucki

Heterochromatynowe białko 1 (ang. *Heterochromatin protein 1, HP1*) jest niehistonowym białkiem jądrowym o masie 18kDa. Pierwsze doniesienia opisywały HP1 jako białko związane z heterochromatyną w jądrach komórek *Drosophila melanogaster,* oraz czynnik zaangażowany w PEV (ang. *Position Effect-Variegation)*, zjawisko wyciszania aktywności genu poprzez ulokowanie go w obszarze heterochromatyny. HP1 występuje w królestwie roślin i zwierząt i jest ewolucyjnie konserwatywne. W komórkach ludzkich występują trzy izoformy HP1: HP1α, HP1β i HP1γ. Cząsteczka HP1 zbudowana jest z N-końcowej chromodomeny (CD, ang. *CHRomatin Organization MOdifier*) oraz podobnej do niej C-końcowej domeny nazywanej ,,chromoshadow" (CSD), które połączone są giętkim rejon zawiasowym. HP1 występuje w formie homo lub heterodimerów, za których tworzenie odpowiada CSD.

CD HP1 łączy się specyficznie z dwu i trzykrotnie metylowaną Lys-9 histonu H3. Potranslacyjnie zmodyfikowane formy HP1 oddziałują z białkami zaangażowanymi m.in. w procesy aktywacji i represji genów, naprawy DNA oraz rearanżacji chromatyny.

W przygotowywanej rozprawie doktorskiej przedstawione zostaną wyniki badań wskazujące na istnienie wcześniej nieznanych oddziaływań HP1β z białkiem PCNA (ang. *Proliferating Cell Nuclear Antigen*) – cząsteczką kluczową w procesie replikacji oraz naprawy DNA. Badania tych oddziaływań przeprowadzono wykorzystując zaawansowane metody mikroskopowe, w tym technikę BiFC (ang. *Bimolecular Fluorescence Complementation*) [1]. Charakterystykę oddziaływań przeprowadzono wykorzystując techniki badania dynamiki białek stosowane w mikroskopii konfokalnej: FRAP oraz FRET-FLIM [2].

Badania opisane w pracy [1] wykazały, iż HP1β oraz PCNA są składnikami (prawdopodobnie wielobiałkowego) kompleksu zaangażowanego w replikację DNA zarówno w trakcie fazy S, jak i podczas procesów naprawy Kompleks ten jest funkcjonalny, gdy HP1 występuje w formie dimeru. Badania opisane w pracy [2] potwierdziły to istnienie kompleksu HP1-PCNA poprzez pomiary wykonane dwiema niezależnymi technikami. Doświadczenia mierzące rezonansowy transfer energii między parą białek wyznakowaną fluorescencyjnie (FRET-FLIM) potwierdziły bliskość umiejscowienia HP1β i PCNA w rejonach, w których prowadzona jest naprawa uszkodzeń DNA oraz w punktowych miejscach replikacji. Badania dynamiki białek (FRAP) pokazały, iż w jądrach komórek niereplikujacych ruchliwość kompleksu zawierającego HP1β oraz PCNA jest zbliżona do ruchliwości białek, które nie wchodzą w interakcję ze składnikami jądra (np. PCNA i GFP), jednakże w fazie S zarówno kompleks, jak i PCNA pozostają trwale związane w miejscach replikacji i nie ulegają dynamicznej wymianie w skali czasowej doświadczenia. W miejscach uszkodzeń DNA, których indukcja przeprowadzona została bez przy użyciu skupionej wiązki światła niebieskiego, bez użycia fotouczulaczy, dynamika kompleksu była złożeniem dwóch powyższych zachowań, co zostało szczegółowo przeanalizowane w pracy [2].

Podsumowując, przygotowywana rozprawa doktorska wskazuje na nową, nieznaną dotąd rolę białka HP1β - zaangażowanie w replikacji DNA. Badania pokazują złożoność kluczowych procesów zachodzących w jądrze komórkowym i przedstawiają HP1β jako wielofunkcyjną cząsteczkę będącą częścią niezbadanego jeszcze kompleksu białkowego.

PUBLIKACJE:

1. Trembecka-Lucas DO, Dobrucki JW. 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. 2012 Jun 1;11(11):2170-5.
2. Trembecka-Lucas DO, Szczurek AT, Dobrucki JW. Dynamics of the HP1β-PCNA-containing complexes in DNA replication and repair. *In press.*