Politechnika Wrocławska

Wydział Chemiczny | Wydziałowy Zakład Biochemii

Prof. dr hab. inż. Andrzej Ożyhar
andrzej.ozyhar@pwr.wroc.pl

Wrocław, 7 czerwca, 2016 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Kamila SOLARCZYKA

Induction of local DNA damage by focused visible light.

Applications in studies of DNA repair

Rozprawa została wykonana w Zakładzie Biofizyki Komórki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Jerzego Dobruckiego i dr Mirosława Zarębskiego (promotor pomocniczy)

Przedstawiona do recenzji i przygotowana w języku angielskim rozprawa mgr Kamila SOLARCZYKA liczy 118 stron. Na pierwszy rzut oka ma ona tradycyjną formę maszynopisu książki. Jednak już pobieżne zapoznanie się z treścią wskazuje, że najważniejszym jej fragmentem jest zbiór tematycznie spójnych artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych (co wypełnia art. 13 pkt. 2 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami), z godnie z którym „rozprawa doktorska może mieć formę (...) spójnego tematycznie zbioru publikacji opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopismach naukowych, określonych przez ministra właściwego do spraw nauki na podstawie przepisów dotyczących finansowania nauki (...)". Zbiór ten, dwie prace opublikowane w *DNA Repair* w 2012 i 2016 roku (IF= 4,274 w 2013 r. i 3,111 w 2014r. – ostatnia dostępna wartość), jest integralną częścią całości, na którą składają się również fragmenty opatrzone następującymi tytułami: *Contents* (2 strony), *List of figures* (1 strona), *List of Abbreviations* (3 strony), *Summary* (2 strony), *Streszczenie* (2 strony), *Preface* (1 strona), *Types* of *DNA damage* (7 stron), *Induction of DNA damage* (13 stron), *DNA repair pathways* (8 stron), *Discussion and future perspectives* (14 stron), *Table: Comparison of methods of local DNA damage induction based on laser microirradtaion* (7 stron), *Conclusions* (2 strony), *References* (22 strony). Z uwagi na wysoki udział wymienionych fragmentów (84 strony na 118) uznałem, że ocenie powinienem poddać nie tylko publikacje, ale całą formę wydawniczą, będącą w istocie maszynopisem książki, której dwa rozdziały stanowią reprinty publikacji. Istotnym problemem w trakcie oceny był fakt, iż chociaż oprócz doktoranta i promotora współautorami publikacji były także

Politechnika Wrocławska
Wydział Chemiczny
Wydziałowy Zakład Biochemii
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50 370 Wrocław

tel. +48 71 320 63 33
fax. +48 71 320 63 37

inne osoby (Mirosław Zrębski, publikacja 1; Magdalena Kordon, Krzysztof Berniak, publikacja 2) w rozprawie nie znalazłem informacji o indywidualnym wkładzie Pana Kamila Solarczyka przy opracowaniu koncepcji, wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników. Ponieważ doktorant jest pierwszym autorem publikacji założyłem, że wkład był znaczący. Jednak, chciałbym aby podczas obrony informacje takie zostały zaprezentowane.

Przedstawiona do oceny rozprawa to opis badań, nad mechanizmem naprawy integralności cząsteczek DNA, które, ulegając pod wpływem endo- i egzogennych czynników modyfikacjom i uszkodzeniom, podlegają nieustającym procesom naprawczym. Mechanizmy naprawy DNA, z uwagi na ich fundamentalne znaczenie dla struktury i funkcji genomu, stały się w ostatnich latach przedmiotem intensywnych badań. Ich postęp wymagał opracowania szeregu biochemicznych i biofizycznych metod pozwalających na generowanie uszkodzeń DNA w żywych komórkach oraz na obserwację zjawisk towarzyszących naprawie uszkodzeń *in situ*. Najpopularniejsze obecnie metody bazują na wykorzystaniu skupionego światła laserowego do wywołania lokalnego uszkodzenia DNA i obserwacji specyficznych dla badanego zjawiska białek znakowanych metką fluorescencyjną. Jednakże wiele z tych metod skutkuje wprowadzeniem bardzo licznych, letalnych uszkodzeń, między innymi, w wyniku użycia egzogennych fotouczulaczy. Wobec powyższego celem rozprawy doktorskiej Pana Kamila Solarczyka było opracowanie metody, która pozbawiona byłaby tych wad – a więc pozwalałaby na generowania subletalnego ograniczonego uszkodzenia DNA w nieobecności egzogennego fotouczulacza. W dalszej kolejności doktorant zmierzał do wykazania, iż nowa metoda może być zastosowana do badania naprawy DNA. Tak postawione cele badawcze zostały w pełni zrealizowane. W *publikacji 1* (Solarczyk K.J., Zarębski M., Dobrucki J.W. (2012) Inducing local DNA damage by visible light to study chromatin repair. *DNA Repair* 11, 966-1002) scharakteryzowane zostały warunki eksperymentalne, w których światło lasera wykorzystywanego jako źródło światła z zakresu widzialnego, w mikroskopie konfokalnym, może służyć indukcji uszkodzenia DNA w żywych komórkach HeLa. Charakter uszkodzenia określono pośrednio poprzez detekcję, w miejscu komórki poddanym działaniu światła laserowego, czynników uczestniczących w różnych ścieżkach naprawy – ufosforylowanej formy histonu H2AX (marker podwójnych pęknięć DNA), czynników XRCC1 i LigIII (czynniki zaangażowane w naprawę pojedynczych pęknięć DNA). Liczba powstających uszkodzeń wzrastała wraz ze zwiększaniem całkowitej dawki światła a ponieważ uszkodzenia te nie hamowały podziałów komórki, uprawnionym był wniosek, że były one skutecznie naprawiane – a więc subletalne.

Publikacja 2 (Kamil J.K., Kordon M., Berniak K., Dobrucki J.W. (2016) 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* 37, 12-21) to opis badań, w których wykorzystana została opracowana wcześniej metoda – w szczególności do zbadania zachowania się czynnika XRCC1 uczestniczącego w procesie naprawy pojedynczych pęknięć DNA. W publikacji przedstawione zostały bardzo

intersujące obserwacje ilustrujące jak złożone i dynamiczne są skutki działania widzialnego światła laserowego na komórkę. W krótkim czasie po naświetleniu fragmentu komórki obserwowane było nagromadzenie XRCC1 w obszarze naświetlonym, przy czym proces gromadzenia był przynajmniej dwuetapowy i charakteryzował się zmiennością rozkładu przestrzennego XRCC. Dokładna analiza jego charakteru pozwoliła na sformułowanie hipotezy, zgodnie z którą XRCC1 jest gromadzone nie tylko w miejscu komórki, w którym dochodzi do uszkodzenia DNA, ale również tworzy ciałka stresowe. Ta ciekawa hipoteza została zweryfikowana eksperymentami, które pokazały, że ciałka XRCC1 tworzone są również w odpowiedzi na ogólny stres komórkowy indukowany szokiem cieplnym.

Tak więc, publikacje składające się na rozprawę doktorską Pana Kamila Solarczyka prezentują wyniki konsekwentnie prowadzonych badań, zmierzających do realizacji jasno określonego celu badawczego. W konsekwencji opracowana została nowa metoda generowania subletalnych uszkodzeń DNA, w zachowawczych warunkach, przez światło widzialne o stosunkowo niewielkiej mocy, bez udziału egzogennych fotouczulaczy. Co ważne, przetestowano jej użyteczność prowadząc analizę procesu gromadzenia XRCC1 w odpowiedzi na naświetlenie fragmentu komórki. Poczynione w trakcie analizy obserwacje były niebanalne, co nie tylko potwierdziło przydatność metody, ale również wniosło istotny wkład w rozwój wiedzy odnośnie mechanizmów naprawy DNA.

Uważam zatem, że omówione powyżej publikacje zawierają oryginalne wyniki i są wzorowym przykładem oryginalnego rozwiązania problemu naukowego, co wypełnia pierwsze z wymagań art13. pkt 1 ustawy o ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami), zgodnie z którym „rozprawa doktorska (...) powinna stanowić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego". Również pozostałe z wymagań ustawy, zgodnie z którymi rozprawa „powinna wykazywać ogólną wiedzę teoretyczna kandydata w danej dyscyplinie naukowej (...) oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej lub artystycznej" są spełnione. Lektura rozdziałów składających się na wstęp teoretyczny rozprawy (*Types* of *DNA damage*, *Induction of DNA damage*, *DNA repair pathways*) a także Tabeli zatytułowanej *Table: Comparison of methods of local DNA damage induction based on laser microirradtaion* nie pozostawia wątpliwości co do spełnienia pierwszego z warunków. Zwraca uwagę dążenie doktoranta do pełnego przedstawienia aktualnego stanu wiedzy o przyczynach i mechanizmach powstawania uszkodzeń DNA a szczególnie o metodach stosowanych do wywołania uszkodzeń, co jasno uzasadnia celowość a także ważność i nowatorstwo prowadzonych badań oraz. Kolejne dowody na to, że Pan Kamil Solarczyk dysponuje głęboką wiedzą w zakresie biofizyki, a także zdolnością do jej wykorzystania w celu przeprowadzenia krytycznej analizy otrzymanych wyników dostarcza lektura fragmentu rozprawy zatytułowanego *Discussion and prespectives*.

Biorąc pod uwagę wartość merytoryczną, zakres i jakość przeprowadzonych badań, rozprawę Pan Kamila Solarczyka oceniam bardzo wysoko. Uważam, że

jako całość badania te pozwoliły na skuteczne i oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Przedstawiona rozprawa świadczy o tym, że Pan Kamil Solarczyk, wykazał się umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, co wypełnia ostatni z wymogów określonych w art. 13, pkt. 1 ustawy o ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki. W związku z tym wnoszę do Rady Wydziału Biochemii Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.