Politechnika Wrocławska
Wydział Podstawowych Problemów Techniki
ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370, Wrocław
tel. / fax. + 48 (71) 327 77 27

Wrocław, 30.04.2019

Recenzja

rozprawy doktorskiej Krzysztofa Berniaka pt. "Dynamika białek XRCC1 I HP1β w ogniskach naprawy DNA – badania metodą FCS"

Nauki biologiczne w ostatnich dziesięcioleciach uległy głębokiej transformacji przejawiającej się, między innymi, konsolidacją dotychczas różnych dyscyplin wiedzy. Nowa interpretacja centralnego dogmatu biologii, maszyny molekularne, zatłoczenie molekularne, architektura molekularna, koordynacja procesów metabolicznych czy biologia systemowa to zagadnienia, które wymagają zastosowania złożonego aparatu badawczego składającego się z zaawansowanych technik eksperymentalnych wspomaganych zaawansowaną analizą danych opartych o dedykowane algorytmy.

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr. Berniaka jest doskonałym przykładem takiego nowoczesnego podejścia poprzez zastosowanie złożonego warsztatu doświadczalnego do opisu procesów molekularnych zachodzących *in situ*. Przedmiotem badań jest określenie zaangażowania białek XRCC1 i HP1 w procesy naprawcze kwasów nukleinowych. Zakres planowanych prac, wybrany model doświadczalny, zastosowane techniki doświadczalne, sposób analizy danych zostały oparte o przesłanki wynikające ze stanu wiedzy. Informacje zawarte w literaturze naukowej, które zostały logicznie i wyczerpująco przedstawione, wskazują, że oba białka zlokalizowane są w nukleoplaźmie, a ich akumulacja skorelowana jest z miejscami, gdzie występują uszkodzenia DNA. W oparciu o te obserwacje mgr Barniak zdefiniował cel badań jako określenie dynamiki białek XRCC1 i HP1 w ogniskach naprawczych gdzie naruszona jest integralność materiału genetycznego. Aby osiągnąć ten ambitny cel należało przygotować odpowiedni warsztat badawczy, na który składają się: zdefiniowanie parametru będącego przedmiotem badania, odpowiedniego obiektu eksperymentalnego, małoinwazyjny kontrast dla białek, możliwość ich modyfikacji na poziomie genu oraz narzędzi badawczych stosownych do ilościowej oceny mierzonych parametrów.

Wszystkie te elementy projektu badawczego zostały zrealizowane w sposób wzorcowy. Aby wskazać na wysoką jakość zaprezentowanych badań zatrzymam się na chwilę na warsztacie badawczym. Parametrem wybranym do analizy był współczynnik dyfuzji oraz jego rozkład dla wybranej populacji białek. Dyfuzja to proces entropowy zachodzący izotropowo w prostych i jednorodnych układach fi-

zycznych czy chemicznych, w których daje się ona racjonalnie opisać za pomocą uśrednionych parametrów makroskopowych (współczynnik dyfuzji, lepkość itp.). W układach biologicznych parametry te nie są już tak oczywiste. Argumenty i modele przedstawione przez mgr. Berniaka pokazują, że zdaje on sobie z tego doskonale sprawę. Dane opisujące dynamikę białek zbierane są dla pojedynczych molekuł a dopiero na tej podstawie szacuje się parametry makroskopowe, które następnie są przedmiotem analizy. Plan doświadczenia zawiera w sobie swoisty bufor, którymi są modele służące do analizy danych oraz do prezentacji uzyskanych wyników. Zmiana tych modeli pozwala, na podstawie posiadanych danych, szacować inne parametry, jeżeli będą ku temu stosowne przesłanki. Współczynnik dyfuzji posłużył w rozprawie mgr. Berniaka do oceny dynamiki białek zgromadzonych w ognisk naprawczych oraz wizualizacji uzyskanych wyników. Autor rozprawy z pewnym rozczarowaniem pokazuje, że uzyskane dane dobrze zgadzają się z prostym i nierzeczywistym modelem. W pracy widać wysiłki autora wskazujące, że stara się on znaleźć efekt chociażby zatłoczenia molekularnego czy spodziewanej kierunkowości zachodzących w układach biologicznych procesów. Przypuszczam, że powodem tego zawodu może być wybrany model eksperymentalny tzn. dynamika białek w relatywnie homogennej przestrzeni chromatyny. Dodatkowo proces będący przedmiotem badań tzn. uszkodzenia nici DNA jest z punktu widzenia lokalizacji losowy, co oznacza, że mechanizmy naprawcze, aby być skuteczne, powinny zachodzić w skali czasowej krótszej od reorganizacji chromatyny, co może oznaczać, że białka te są równomiernie rozłożone w objętości jądra (co autor zresztą pokazuje na uzyskanych obrazach mikroskopowych). Tak więc w tym przypadku wybrany, oparty o prostą dyfuzję, model okazuje się zaskakująco dobry do opisu dynamiki formowania się kompleksów białkowych w miejscach uszkodzenia DNA, pomimo niewątpliwie kierunkowego charaktery samych procesów naprawczych.

Wybrane techniki pomiarowe są niezmiernie wymagające zarówno z punktu widzenia technicznego zaawansowania sprzętu, koniecznych badań kontrolnych oraz złożonej akwizycji i analizy danych. Mgr Berniak pokazał, że posiada doskonały warsztat doświadczalny, starannie wybiera techniki i metody pomiarowe, a wszystkie pomiary wykonuje z wielką starannością, uwzględniając przy tym czynniki mogące wpłynąć na mierzone wielkości. Doskonała znajomość metodyki badawczej widać chociażby na poziomie wyboru techniki pomiarowej FLIP a nie FRAP. W tym przypadku wybór był uwarunkowany naturą badanego obiektu (możliwość generowania uszkodzeń DNA w trakcie naświetlania wiązką wzbudzającą) i sposobu uzyskania kontrastu (blaknięcia fluorescencji). W innym miejscu, w trakcie kalibracji FCS i FCCS autor rozprawy pokazuje doskonałą znajomość uwarunkowań technicznych używanego sprzętu oraz staranność w uwzględnieniu czynników zakłócających pomiar. Sposób akwizycji danych pokazuje doskonałe zrozumienie modelu doświadczalnego oraz molekularnych procesów związanych z zachowaniem się znaczników. Analiza uzyskanych danych charakteryzuje się rzetelnością przygotowanych procedur, dbałością o statystyczną istotność pomiarów oraz biegłością w

łączeniu zróżnicowanych narzędzi numerycznych do przetwarzania dużej ilości danych. Model doświadczalny był także modyfikowany na poziome samych białek poprzez ekspresję genetycznych mutantów o znanych zmianach struktury czy właściwości. Badano wpływ delecji domeny BRCT2 zlokalizowanej na C-końcu białka XRCC1 skutkującej brakiem jego gromadzenia się w ognisku naprawy DNA. W celu sprawdzenia wpływu domeny BRCT1 białka XRCC1 na jego mobilność w nukleoplazmie zastąpiono lizynę w pozycji 360 argininą. Podmiana aminokwasu w tym miejscu prowadzi do nieprawidłowej domeny i przez to do jej dezaktywacji. Dysfunkcja tej domeny także powoduje zaburzenie gromadzenia się białka XRCC1 w miejscu ognisku naprawy DNA. Badano także mutanty o zmniejszonej podatności na fosforylację, w tym mutację S371A, gdzie w pozycji 371 seryna została zastąpiona alaniną, w ten sposób pozbawiając białko miejsca fosforylacji przez kinazę DNA-PKcs. Mutacja punktowa T284A to podstawienie treoniny w pozycji 284 alaniną. Jest to miejsce fosforylacji dla kinazy Chk2 oraz mutant białka XRCC1, który zawierał cztery mutacje punktowe dezaktywujące miejsca fosforylacji. Seryna w pozycji 421, treonina w pozycji 488, seryna w pozycji 518 oraz treonina w pozycji 523 zostały zastąpione alaniną (S412A, T488A, S518A oraz T523A) eliminując w ten sposób możliwość fosforylacji białka przez kinazę kazeinową 2. Pokazuje to, że zastosowany model doświadczalny jest wynikiem dobrego warsztatu w zakresie biologii molekularnej i fizjologii komórki.

Na szczególna uwagę zasługują jakość akwizycji danych oraz poprawność zastosowanego warsztatu analitycznego uzupełnionego autorską aplikacją pozwalającą na jednoczesną analizę ilościową dużej ilości obrazów.

Szczegółowy cel badań oraz oczekiwane wyniki autor zdefiniował następująco: „… ustalenie roli pełnionej przez białka XRCC1 oraz HP1 zgromadzone w rejonie uszkodzenia DNA. ….. Postulowane zwiększenie liczby miejsc wiązania dla obu białek powinno spowodować zmniejszenie tempa dyfuzji oraz zwiększenie czasu przebywania XRCC1 i HP1 w obszarach prowadzonej aktywnie naprawy DNA. Taka zmiana dynamiki obu białek powinna być wykrywalna technikaami FCS i FLIP."

Wyniki zaprezentowane w pracy pokazują, że tak zdefiniowany cel badań został osiągnięty. Uzyskane dane ilościowe pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków (cytując):

„ - W ognisku DDR następuje **gwałtowny spadek dynamiki** XRCC1 oraz HP1 w porównaniu do obszarów nieuszkodzonej chromatyny.

- Wśród cząsteczek wchodzących w skład ogniska DDR **ponad 30%** z nich porusza się bardzo wolno.

Politechnika Wrocławska
Wydział Podstawowych Problemów Techniki
ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370, Wrocław
tel. / fax. + 48 (71) 327 77 27

- Część cząsteczek obu białek porusza się w ognisku DDR wolniej niż nawet nieuszkodzona chromatyna, co może wskazywać na ich uczestniczenie **w stabilizowaniu lokalnej struktury chromatyny** poprzez współtworzenie węzłów w jej sieci pomiędzy fragmentami chromatyny."

- Ruchliwość najwolniejszych subpopulacji XRCC1 i HP1 w obszarze naprawy DNA jest **bardzo do siebie podobna**.

Wyniki te pozwalają stwierdzić, że oba białka pojawiają się w ogniskach naprawczych a ich dyfuzja jest zmieniona wskazując na lokalną agregację w duże kompleksy makromolekularne. Dane te są ważnym krokiem w formułowaniu szczegółowych modeli funkcjonalnych opisujących mechanistycznie molekularne procesy naprawcze uszkodzonego materiału genetycznego.

Zarówno zastosowana metodyka doświadczalna jak i ilościowa analiza wyników doskonale zaplanowanych doświadczeń, co w połączeniu z dużą ilością nowych i wartościowych danych sprawiają, że rozprawa spełnia z nadmiarem kryterium nowości.

Z technicznego punktu widzenia praca jest dobrze napisana. Wyniki badań są przejrzyście zaprezentowane i logicznie uporządkowane. Całość opatrzona jest dobrze zorganizowanym streszczeniem i wstępem, z których jasno wynikają przesłanki wykorzystane do zdefiniowania celu badań. Materiały i metody są precyzyjne i szczególnie wyczerpujące w zakresie technik pomiarowych oraz sposobu akwizycji i analizy danych. Szczegółowa dyskusja wyników zakończona treściwym podsumowaniem i krótkim opisem planów na przyszłość pokazuje rolę zaprezentowanych badań dla pełnego opisu procesów molekularnych odpowiedzialnych za funkcjonalność materiału genetycznego. Argumenty merytoryczne zaprezentowane w pracy są oparte na 171 pozycjach bibliograficznych z czego około 25 jest z ostatnich trzech lat. Pokazuje to, że autor powołuje się do aktualny stanu wiedzy.

W tym miejscu pozwolę sobie zadać pytanie dotyczące interpretacji uzyskanych wyników. W jaki sposób można pogodzić fakt, że białko XRCC1 pozbawione jest miejsc fosforylacji nie wiąże się z ogniskami DDR co można oznaczać obniżoną zdolność do gromadzenia się w miejscach naprawczych? Widomo, że fosforylacja zmienia balans hydrofobowo/hydrofilowy białka w kierunku hydrofilowości. Brak możliwości fosforylacji powinien zwiększyć jego podatność do agregacji, przeciwnie do uzyskanych wyników doświadczalnych. Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku anemii sierpowatej, w tym przypadku mutacja punktowa w łańcuchu ß hemoglobiny, gdzie hydrofilowy kwas glutaminowy jest podstawiony hydrofobową waliną, powoduje powstawanie złogów hemoglobiny co skutkuje przedwczesna eliminacją erytrocytów z krwioobiegu.

Politechnika Wrocławska
Wydział Podstawowych Problemów Techniki
ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370, Wrocław
tel. / fax. + 48 (71) 327 77 27

Podsumowując, uważam, że Mgr Berniak zaprezentował nowe i ważne wyniki prac doświadczalnych uzyskane z wykorzystaniem nowoczesnych technik badawczych. Przedłożona mi do oceny rozprawa, w połączeniu z opublikowanymi już artykułami (FASEB J. – IF=.5,5, J. Virology- IF = 4,7, Oncotarget – IF=5-6, DNA Repair – IF=4,5 i 3 publikacje w Cytometry A – IF=3,26), pokazują, że mgr. Berniak jest sprawnym eksperymentatorem, który potrafi dobrze sformułować problem badawczy, zaproponować jego rozwiązanie z wykorzystaniem nowoczenych narzedzi technicznych i numerycznych a uzsykane wyniki zaprezentować w postaci wartościowych publikacji.

Biorąc wszystko powyższe pod uwagę stwierdzam, że rozprawa mgr. Krzysztofa Berniaka spełnia z nadmiarem wymagania stawiane w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytułach naukowych wraz z późniejszymi poprawkami. W związku z powyższym wnoszę do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr. Krzysztofa Berniaka do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Dodatkowo, biorąc pod uwagę merytoryczną zawartość przedłożonej mi do oceny pracy oraz dorobek publikacyjny wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr. Krzysztofa Berniaka.

Prof. dr hab. inż. Marek Langner