13 -05- 2019

mgr Krzysztof Berniak
Zakład Biofizyki Komórki
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Promotor: **prof. dr hab. Jerzy Dobrucki**

Streszczenie pracy doktorskiej **„Dynamika białek XRCC1 i HP1 w ogniskach naprawy DNA - badania metodą FCS"**

Jedno- i dwuniciowe pęknięcia DNA (odpowiednio z ang *Single Strand Break,* SSB i z ang *Double Strand Break,* DSB) powstają w jądrze komórkowym na skutek działania zarówno czynników endogennych (jak np. topoizomeraz, reaktywnych form tlenu powstałych podczas procesów metabolicznych), jak i egzogennych (np. promieniowania UV, promieniowania jonizującego). Nagromadzenie obu rodzajów pęknięć DNA może doprowadzić do zahamowania replikacji, transkrypcji lub śmierci komórki. Mechanizmy procesów naprawy zarówno SSB, jaki i DSB, nie są w pełni poznane. W przeprowadzonych doświadczeniach badałem dwa białka jądrowe, które zaangażowane są w proces naprawy SSB (XRCC1) oraz DSB (HP1) i gromadzą się w rejonach wokół uszkodzonego DNA. Wysoka intensywność fluorescencji ogniska świadczy o lokalnym wysokim stężeniu tych białek. Nie wiadomo jaka jest rola tak dużej liczby zgromadzonych w ognisku naprawy cząsteczek. Zastosowanie metody Spektroskopii Korelacji Fluorescencji (z ang. *Fluorescence Correlation Spectroscopy,* FCS) pozwoliło na wykazanie istnienia subpopulacji tych białek różniących się mobilnością, co pośrednio dostarcza informacji na temat mechanizmu wiązania oraz ich roli w naprawie DNA.

Białko jądrowe XRCC1 (z ang. *X-ray Repair Cross-Complementing Protein 1*) jest to nieenzymatyczny czynnik uczestniczący w procesie naprawy jednoniciowych pęknięć nici DNA. Pełni ono rolę platformy dla innych białek zaangażowanych w ten proces takich jak ligaza DNA III, polimerazy PARP1, PARP2, polimerazy β czy glikozydazy OGG1.

Heterochromatynowe białko 1 (z ang. *Heterochromatin Protein 1*, HP1) jest jednym z głównych składników heterochromatyny oraz istotnym czynnikiem zaangażowanym w proces wyciszania genów ulokowanych w obrębie heterochromatyny (*Position-Effect Variegation, PEV*). Różne potranslacyjnie zmodyfikowane formy HP1 są zaangażowane w wiele procesów jądrowych, w tym tzw. 'remodeling chromatyny', replikację i naprawę DNA. Białko HP1 ulega rekrutacji w obszar jądra, w którym zostały indukowane fotouczulane uszkodzenia oksydacyjne[1]. Bezpośrednio w proces naprawy zaangażowanych jest niewiele cząsteczek HP1. Tworzą one kompleks z PCNA. Ich wykrycie było możliwe metodą dwucząsteczkowego fluorescencyjnego dopełnienia (z ang. *Bimolecular Fluorescence Complementation Assay,* BiFC)[2]. Rola pozostałych cząsteczek gromadzących się w obszarze okalającym miejsce uszkodzenia DNA pozostaje niejasna.

Dynamika białek jądrowych i włókien chromatyny może być badana z zastosowaniem zaawansowanych technik mikroskopii fluorescencyjnej, takich jak FCS i utraty fluorescencji w wyniku fotoblaknięcia (z ang. *Fluorescence Loss In Photobleaching,* FLIP). Metoda FLIP opiera się na monitorowaniu spadku intensywności fluorescencji z obszaru poza

fotoindukowanym blaknięciem przy równoczesnym prowadzeniu tegoż procesu blaknięcia. Z kolei bardziej wyrafinowana metoda FCS pozwala oszacować współczynnik dyfuzji, stężenie czy stan agregacji danego białka fuzyjnego. W pomiarze FCS rejestrowane są fluktuacje fluorescencji z subfemtolitrowej objętości pomiarowej utworzonej poprzez ogniskowanie wiązki lasera w wybranym miejscu w komórce. Krzywa FCS tworzona jest poprzez analizę korelacyjną zarejestrowanej fluktuacji fluorescencji. Z dopasowania modeli do krzywej można uzyskać informacje na temat stężenia i możliwych subpopulacji różniących się mobilnością. Modele takie uwzględniają fluktuacje fluorescencji wywołane przechodzeniem cząsteczek w trypletowy stan ciemny oraz dyfuzję normalną lub anomalną wieloskładową.

Głównymi celami pracy było zbadanie mobilności wybranych białek zaangażowanych w proces naprawy jedno- i dwuniciowych pęknięć cząsteczki DNA w rejonie lokalnego uszkodzenia chromatyny. Dodatkowo porównałem mobilność znakowanego fluorescencyjnie białka XRCC1 formy dzikiej z jego wybranymi znakowanymi mutantami zarówno w nukleoplazmie, jak i w miejscu prowadzonej aktywnie naprawy DNA.

Pomiary FCS wykonywałem na komórkach HeLa z przejściową ekspresją białek jądrowych z metką fluorescencyjną. W celu oszacowania wpływu metki fluorescencyjnej na mobilność takiego białka fuzyjnego dokonałem także pomiaru mobilności samego białka fluorescencyjnego w jądrze komórkowym. Zarówno wzmocnione zielone białko fluorescencyjne (z ang. *enhanced green fluorescent protein,* eGFP), jak i monomeryczne czerwone białko fluorescencyjne (z ang. *monomeric red fluorescent protein,* mRFP) wykazują wysoką mobilność w jądrze komórkowym (w obu przypadkach współczynnik dyfuzji $D > 30\ \mu m^2/s$). Analiza statystyczna dopasowania modeli do krzywych autokorelacji dla wolnych metek wskazuje w obu przypadkach, że model dyfuzji prostej z jedną składową jest wystarczający do opisu ich mobilności w jądrze komórkowym.

Pomiary FCS białka fuzyjnego mRFP-XRCC1 wykazały istnienie co najmniej dwóch subpopulacji XRCC1 różniących się mobilnością w nukleoplazmie. Mobilność postulowanych subpopulacji różni się około dwudziestokrotnie. Uzyskane wyniki mogą wskazywać, że część cząsteczek XRCC1 oddziałuje z chromatyną. Dla jednego ze zbadanych mutantów $XRCC1^{P537STOP}$, w którym brakuje domeny BRCT2, uzyskane wyniki wskazują na wzrost mobilności w obszarze nukleoplazmy, ale także na spadek ilości białka poruszającego się wolniej. W ogniskach naprawy DNA XRCC1 wykazuje dynamiczny charakter. Zgromadzone XRCC1 znajdują się w równowadze dynamicznej z otoczeniem. W sposób ciągły następuje wymiana cząsteczek XRCC1 zakumulowanych w ogniskach. Mobilność cząsteczek XRCC1 w obszarze naprawy jest mniejsza niż mobilność białka XRCC1 w nukleoplazmie. Natomiast dezaktywacja wybranych miejsc fosforylacji nie wpłynęła na zdolność do gromadzenia się XRCC1 w obszarze prowadzonej naprawy, a jego mobilność nie różni się od znakowanego białka XRCC1 formy dzikiej.

Wyniki doświadczeń FCS dla wszystkich znakowanych paralogów HP1 wskazują na istnienie dwóch subpopulacji w nukleoplazmie. Pierwszą, szybszą można utożsamiać ze swobodnie poruszającymi się cząsteczkami HP1, natomiast drugą z subpopulacją związaną z chromatyną. Interpretacja tak jest zasadna także na podstawie uzyskanych wyników dla znakowanego histonu H2B, które wskazują na bardzo podobną wartość współczynnika dyfuzji subpopulacji

tego histonu oraz HP1. Mobilność cząsteczek eGFP-HP1 jest mniejsza niż mRFP-XRCC1 m.in. z powodu większego stopnia oddziaływania HP1 z chromatyną. HP1 w odpowiedzi na lokalnie powstałe uszkodzenie DNA tworzy ogniska, które także wykazują się wewnętrzną dynamiką. Cały czas podczas prowadzonej naprawy następuje wymiana cząsteczek HP1 pomiędzy utworzonym ogniskiem a pulą znajdującą się w nukleoplazmie. Na podstawie analizy pomiarów FCS postulować można także istnienie co najmniej trzech subpopulacji HP1 w ognisku naprawy. Pierwsza opisuje cząsteczki HP1 nie wiążące się do chromatyny, jednak ze względu na lokalne zagęszczenie molekularne[3] ma utrudnioną możliwość poruszania się w porównaniu do analogicznej niezwiązanej subpopulacji HP1 w nukleoplazmie. Dwie pozostałe subpopulacje znajdujące się w ognisku naprawy DNA, o współczynnikach dyfuzji $D_2^{HP1\beta(ognisko)} = 1{,}13\pm0{,}78\ \mu m^2/s$ i $D_3^{HP1\beta(ognisko)} = 0{,}17\pm0{,}05\ \mu m^2/s$, zapewne oddziałują z chromatyną. Jedna z postulowanych subpopulacji porusza się z tempem domniemanej mobilności chromatyny w miejscu uszkodzenia. Możliwe, że obie subpopulacje uczestniczą w tworzeniu mostków między włóknami chromatyny i w jej lokalnej stabilizacji.

Podsumowując, w niniejszej pracy doktorskiej wykorzystano zaawansowane techniki mikroskopii konfokalnej do pomiaru mobilności wybranych białek naprawczych w nukleoplazmie, a także w obszarze ich gromadzenia powstałego na skutek lokalnego uszkodzenia DNA wywołanego światłem widzialnym. Tworzone ogniska składają się z cząsteczek będących w równowadze dynamicznej z otoczeniem, a ich lokalna mobilność w obszarze ogniska naprawy jest znacząco mniejsza od ich mobilności w nukleoplazmie. Prawdopodobnie w obszarze naprawy następuje wzrost liczby miejsc wiązania na chromatynie dla cząsteczek XRCC1 i HP1, co może oznaczać, że zgromadzone białka mogą także uczestniczyć w procesie przywoływania pozostałych czynników lub w lokalnym stabilizowaniu chromatyny.

1. Zarebski, M., Wiernasz, E. & Dobrucki, J. W. Recruitment of heterochromatin protein 1 to DNA repair sites. *Cytometry. A* **75,** 619–25 (2009).
2. Trembecka-Lucas, D. Heterochromatin Protein (HP1) dimer and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) interact in DNA replication and repair - PhD Thesis. (2013).
3. Minton, A. P. The Influence of Macromolecular Crowding and Macromolecular Confinement on Biochemical Reactions in Physiological Media. *J. Biol. Chem.* **276,** 10577–10580 (2001).

Krzysztof Bernik.