



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

Toruń, dnia 11.01.2023 r.

dr hab. Dariusz Jan Smoliński prof. UMK
Katedra Biologii Komórkowej i Molekularnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytetu M. Kopernika w Toruniu

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pana magistra Oskara Szelesta pt. „Aktywność ścieżek naprawy jednoniciowych pęknięć DNA, *short-patch* oraz *long-patch*: zależność od fazy cyklu podziałowego i dostępności białek PCNA oraz XRCC1”

Rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Jerzego Dobruckiego w Zakładzie Biofizyki Komórki, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Niniejszą ocenę wykonałem jako osoba powołana do funkcji recenzenta na podstawie decyzji Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii.

Uszkodzenia jądrowego DNA powstają w jądrze komórkowym na skutek działania czynników endogennych jak i egzogennych. Procesy naprawy powstających pęknięć DNA są bardzo istotne w zapobieganiu nagromadzenia uszkodzeń prowadzących do powstawania mutacji. Zaburzenia naprawy DNA są postrzegane obecnie jako jeden z istotnych czynników prowadzących do transformacji nowotworowej. Nagromadzenie jednoniciowych pęknięć DNA oraz przekształcenie w pęknięcia dwuniciowe może doprowadzić również do zahamowania replikacji, transkrypcji lub śmierci komórki.

Uszkodzenia DNA można sklasyfikować jako endogenne oraz egzogenne. Pierwsze z nich są najczęściej wywoływane poprzez działanie reaktywnych form tlenu, które powstają w procesach metabolicznych komórki. Egzogenne uszkodzenia są wywoływane czynnikami zewnętrznymi np. promieniowaniem ultrafioletowym lub jonizującym, wysoką temperaturą lub związkami chemicznymi (np. nadtlenkiem wodoru).

Okazuje się jednak, że również ekspozycja na światło z zakresu widzialnego generuje uszkodzenia oksydacyjne oraz jedno- i dwuniciowe pęknięcia DNA i to pomimo znikomej absorpcji światła widzialnego przez DNA. Czas ekspozycji chromatyny na światło i

intensywność światła mają istotny wpływ na liczbę powstających uszkodzeń i na efekt końcowy, którym może być nawet śmierć komórek.

Mechanizm indukcji uszkodzeń DNA przez światło widzialne nie został jeszcze dokładnie poznany. Sugeruje się, że rolę w tym procesie mogłaby odgrywać fotoliza wody, prowadząca do powstania wolnych rodników. Przypuszcza się również, że w procesie powstawania uszkodzeń mogą brać udział występujące w komórkach porfiryny, bilirubina, flawiny czy NADH/NADPH.

Podczas pęknięć pojedynczej nici DNA (Single Strand Break, SSD) integralność chromosomu nie jest naruszona. SSB to jednak najczęściej występujące uszkodzenia DNA w komórce z częstością zachodzenia rzędu tysięcy razy w ciągu doby na komórkę. Za ich naprawę głównie odpowiada szlak zwany SSBR (Single-Strand Break Repair).

Drugim zagrożeniem dla komórki są dwuniciowe pęknięcia DNA. Następuje wtedy utrata ciągłości chromosomu. Jednym z procesów zaangażowanych w naprawę DNA w sposób pośredni jest naprawa przez wycięcie fragmentu polinukleotydowego i ponowna synteza z udziałem polimerazy DNA. Jedną z podstawowych dróg naprawy uszkodzonego DNA na drodze pośredniej jest szlak naprawy poprzez wycinanie zasad (Base Excision Repair, BER). Do naprawy uszkodzeń, takich jak połączenia wewnątrz nici czy zasady z przyłączonymi grupami chemicznymi, wykorzystywany jest szlak NER przez wycięcie nukleotydów (Nucleotide Excision Repair, NER). Jest to proces podobny do naprawy BER, lecz nie poprzedza go selektywne wycinanie zasad. W ścieżce NER usuwany jest nie tylko uszkodzony nukleotyd, ale cały otaczający go fragment łańcucha polinukleotydowego. Jest to jeden z najbardziej powszechnych szlaków naprawy DNA w komórkach eukariotycznych pozwalający na wszechstronne naprawy zmian strukturalnych w DNA.

Od wielu lat procesy naprawy DNA stanowią obiekt intensywnych badań biologów molekularnych. Ścieżka BER wykorzystuje wiele różnych enzymów i białek naprawczych. Jądrowe białko XRCC1 (X-ray Repair Cross Complementing Protein 1), jest zaangażowane w ścieżki naprawy jednoniciowych uszkodzeń DNA – SSBR. Oddziałuje ono z innymi czynnikami naprawczymi (m.in. polimerazami PARP1 i PARP2, polimerazą β , kinazą/fosfatazą polinukleotydową PNKP, Ligazą I).

Inną grupą białek, które oddziałują z XRCC1 w procesie naprawy, są komponenty aparatu replikacyjnego, takie jak PCNA, glikozydaza DNA UNG2 i polimeraza DNA α -primaza. Interakcje te są istotne podczas naprawy jednoniciowych pęknięć DNA powiązanych z replikacją. Badania wskazują, że aktywacja PARP i rekrutacja XRCC1 są silnie powiązane ze stresem replikacyjnym i naprawą SSBs powstałych podczas replikacji. PCNA wchodzi w

interakcję z XRCC1, co pokazały dane biochemiczne (immunoprecypitacja) oraz mikroskopowe – sąsiedztwo obu białek w ogniskach replikacyjnych. Te dane mogą wskazywać na naprawę jednoniciowych pęknięć DNA powstałych wskutek nieprawidłowego procesu replikacji. Białko PCNA jest również obecne w ścieżce *long-patch* BER wraz z ligazą 1 czy FEN1.

Główne etapy naprawy ścieżką BER to: (1) rozpoznanie i wycięcie uszkodzonej/niewłaściwej zasady, (2) nacięcie w powstałym miejscu apurynowym/apirymidynowym, (3) przetwarzanie końców, (4) wstawienie poprawnego nukleotydu, (5) łączenie końców. W ścieżce *short patch* BER polimeraza β lub polimeraza λ usuwa grupę 5'-dRP i wstawia brakujący nukleotyd. Na ostatnim etapie zachodzi ligacja. W procesie naprawy może dojść do sytuacji, w której grupa 5'-dRP w miejscu przerwy jest słabym substratem dla Pol β . W takich wypadkach uruchamiana jest ścieżka naprawcza *long-patch*.

Celami niniejszej pracy było zbadanie aktywności ścieżek naprawy jednoniciowych pęknięć DNA w różnych fazach cyklu podziałowego. Podjęto się także sprawdzenia, które ścieżki naprawy jednoniciowych pęknięć DNA (SP czy LP) są aktywowane w komórkach niereplikujących i replikujących, oraz określenia poziomu wysycenia naprawy przez indukcję wielu jednoniciowych pęknięć DNA wygenerowanych w krótkich odstępach czasu. To bardzo ciekawe i ambitne cele.

Układ pracy jest zgodny z zasadami redagowania rozpraw doktorskich. Rozprawa została podzielona na standardowe w pracach biologicznych rozdziały. Rozdział wstęp wprowadza w tematykę prowadzonych badań związanych z uszkodzeniami DNA, konsekwencje biologiczne takich uszkodzeń, a także związek pomiędzy naprawą DNA, a momentem cyklu komórkowego. Druga część wstępu opisuje jednoniciowe pęknięcia DNA, ścieżki naprawy takich uszkodzeń oraz metody wykorzystywane w badaniach w celu wywołania takich uszkodzeń. Szczegółowo opisuje naświetlanie skupioną wiązką światła widzialnego użytego podczas badań w tej pracy do generowania uszkodzeń DNA. Na końcu Autor opisał budowę i rolę białek XRCC1 oraz PCNA których rolę w procesach naprawczych pęknięć DNA szczegółowo analizował w niniejszej pracy. Rozdział poświęcony materiałowi i metodom podzielony został na podrozdziały w których szczegółowo opisane zostały metody i techniki doświadczalne zastosowane w pracy. Zarówno wstęp jak i materiał i metody ilustrowane są fotografiami, tabelami i rycinami dobrze obrazującymi i uzupełniającymi treści zawarte w tych rozdziałach. Rozdział ten został napisany poprawnie i skrupulatnie. W tym miejscu

pozwolę sobie zadać pierwsze pytanie do Doktoranta. Dlaczego do badań wykorzystano komórki HeLa będące komórkami ludzkimi, wyizolowanymi z komórek nabłonka szyjki macicy. Komórki takie w warunkach naturalnych nie są ekspozowane na światło widzialne. Czy były próby badania linii komórkowych komórek pochodzących z tkanek normalnie ekspozowanych na światło widzialne takich komórki fibroblastów (*human secondary fibroblasts*, HSF)?

Najobszerniejszą część rozprawy stanowi opis wyników badań. Wszystkie wyniki zostały opisane niezwykle szczegółowo, świetnie zilustrowane starannie przygotowanymi wykresami, tabelami i wysokiej jakości dokumentacją fotograficzną. Tak wyczerpująca prezentacja uzyskanych wyników zasługuje na uznanie.

Do najważniejszych wyników pracy należy zaliczyć:

- Kluczowe dla dalszych badań podjętych w tej pracy jest wykazanie, że wiązką światła widzialnego o niskiej intensywności wywołuje pęknięcia DNA. Ponadto wykazanie, że dzieje się tak nawet bez udziału egzogennych fotouczulaczy.
- Skuteczne zastosowanie w badaniach bardzo czułych narzędzi badawczych. Mam tu na myśli po pierwsze: generowanie pojedynczych jednoniciowych pęknięć DNA wiązką światła widzialnego o niskiej kontrolowanej energii. Ponadto precyzyjne tylko lokalne generowanie tych zmian skupioną wiązką laserową. Pozwoliło to nie działać destrukcyjnie na pozostałą część jądra oraz cytoplazmy. Ingerencja jaka musiała być wykonana w zaplanowanym eksperymencie, w sposób minimalny oddziaływała na inne aspekty funkcjonowania badanych komórek. Uważam, że takie zbliżenie się do warunków fizjologicznych w indukowanym eksperymencie, było kluczowe dla wiarygodności uzyskanych dalszych wyników.
- Po drugie skuteczne wykrywanie tych pojedynczych pęknięć DNA, co następnie pozwoliło na precyzyjną analizę poszczególnych ognisk naprawczych. Białko XRCC1 może być traktowane jako marker obecności jednoniciowych pęknięć DNA. Jego zgromadzenie się może świadczyć o tym, że doszło do rozpoczęcia procesu naprawy, który można następnie badać.
- Wykazanie, że w komórkach podczas replikacji jednoniciowe pęknięcia DNA formują mniej ognisk białka XRCC1 niż w komórkach niereplikujących. Wskazuję to na zaangażowanie tego białka jednocześnie w proces replikacji i jego mniejszą dostępność w procesach naprawczych. Sposobem radzenie sobie z tym problemem

jaki występuje w komórkach podczas replikacji jest szybszy bardziej efektywny (krótszy w czasie) proces naprawczy z udziałem tego białka.

- Zaprezentowane w pracy wyniki pokazują, że jeśli białko PCNA zaangażowane jest w proces replikacji, kiedy dochodzi do powstania SSBs, to istnieje większe prawdopodobieństwo, iż aktywowana zostanie ścieżka naprawy SP.
- Otrzymane wyniki wskazują również na to, że komórki nie są zdolne do naprawy wielu SSBs, które pojawiły w dużej liczbie w krótkim czasie. Dodatkowo zaobserwowano, że najwięcej białka XRCC1 rekrutowane jest do pierwszych lokalnych uszkodzeń, a wraz z indukcją kolejnych liczba rekrutowanych do uszkodzenia DNA cząsteczek spada.

Bardzo wysoko oceniając uzyskane wyniki, mam kilka pytań, które są bardziej komentarzami niż zastrzeżeniami:

- 1) W pracy zastosowano metody immunofluorescencyjne z detekcją za pomocą przeciwciał obu badanych białek. Metoda ta została użyta jako metoda kontrolna obserwowanych procesów. Czy prowadzone były też inne dodatkowe kolokalizacje z użyciem przeciwciał do innych białek biorących udział w naprawie DNA metodą kolokalizacji z białkiem XRCC1 lub białkiem PCNA? Badania takie pozwoliłyby na lepszą identyfikację molekularną zidentyfikowanych miejsc naprawy DNA.
- 2) Zastanawiam się czy dla pełnej identyfikacji wszystkich miejsc naprawczych możliwe było zastosowanie dodatkowo metody detekcji syntezy DNA poprzez zastosowanie inkubacji z EdU lub poprzez zastosowanie inkubacji z BrdU, które to metody są z powodzeniem stosowane w Zakładzie Biofizyki Komórki. Taka metoda wymagała by wcześniejszych inkubacji znakowanymi nukleotydami, następnie wykonanie doświadczeń *in vivo* detekcji białek fluorescencyjnych i ponownie detekcji *in situ* wszystkich miejsc naprawczych dostępną tą bezpośrednią metodą. Dodatkowo w komórkach będących w fazie S pozwoliło by to na identyfikację także miejsc replikacji i być może jakąś analizę przestrzenną obu procesów: naprawy DNA i procesu replikacji. Teoretycznie jest to możliwe dla laika, ale być może jednak jest to praktycznie nie możliwe. Proszę o komentarz w tej sprawie.
- 3) Z ciekawości zapytam się czy poza bezpośrednimi metodami z inkubacją znakowanych nukleotydów w żywych komórkach w detekcji miejsc naprawy DNA,

stosowane są metody in situ post inkubacyjne z użyciem np. wszechstronnego enzymu TdT mogącego generować syntezę dowolnych nukleotydów do wolnych końców 3' w DNA? Czy jednak krótki czas na wystąpienie takiej przerwy w DNA czy fizyczna niedostępność dla enzymu uniemożliwia stosowanie takiej metody in situ?

Podsumowując, rozprawa doktorska Pana mgr Oskara Szelesta zawiera ważne i oryginalne wyniki, świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu doktoranta do prowadzenia badań. Wyszczególnione drobne uwagi wynikają z obowiązku recenzenta i nie mają one wielkiego wpływu na wysoka ocenę pracy.

W podsumowaniu, na podstawie dokonanej wysoce pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej, stwierdzam, że recenzowana praca spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016 r. poz.882) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne UJ o dopuszczenie Pana mgr Oskara Szelesta do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na oryginalność i wysoką wartość naukową wyników wnoszącą do istniejącej wiedzy ważne fakty, pozwalam sobie złożyć wniosek do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne UJ o wyróżnienie tej rozprawy stosowną nagrodą.

dr hab. Dariusz Jan Smoliński, prof. UMK