

# **Charakterystyka ognisk naprawczych 53BP1 we wczesnej odpowiedzi na klaster dwuniciowych pęknięć DNA indukowanych metodą CRISPR-Cas9 lub światłem widzialnym**

## **Streszczenie**

Zachowanie stabilności genomu jest podstawową cechą komórek, która zapewnia im przetrwanie i możliwość przekazania nienaruszonego materiału genetycznego komórkom potomnym. Mimo że w ciągu doby powstają tysiące różnych rodzajów endogennych uszkodzeń DNA, geny wykazują niezwykłą stałość sekwencji, a współczynnik mutacji w komórkach prawidłowych wynosi  $10^{-10}$  na nukleotyd na komórkę na pokolenie. Procesy komórkowe odpowiedzialne za tak niski wskaźnik mutacji cechują się znakomitą dokładnością i większość uszkodzeń DNA naprawiana jest bezbłędnie. O ile endogenne uszkodzenia genomu wynikające ze zwykłej aktywności komórki wydają się mało groźne i dzięki bezbłędnym mechanizmom naprawczym są one usuwane, to wszelkie zaburzenia aktywności komórki wynikające z działania czynników endogennych, skutkują nagromadzeniem się szkodliwych metabolitów, wolnych rodników lub reaktywnych form tlenu. Może to sprzyjać akumulacji uszkodzeń DNA, które jeśli nie zostaną naprawione, mają poważne konsekwencje, prowadząc do powstawania mutacji, zatrzymania postępu cyklu komórkowego, kancerogenezy, aktywacji apoptozy i ostatecznie do śmierci komórki. Komórki nowotworowe z kolei charakteryzują się wieloma zaburzeniami w stosunku do komórek prawidłowych, począwszy od rozregulowanego cyklu komórkowego, nadmiernej aktywności metabolicznej i proliferacji, skończywszy na wysokiej liczbie mutacji w genomie i nieprawidłowości w kariotypie. Komórki nowotworowe mogą zatem wykazywać różnice w działaniu mechanizmów naprawy uszkodzeń DNA względem tych, które występują w komórkach prawidłowych, zatem dokładne zbadanie aktywności tych procesów jest kluczowe dla zrozumienia fenomenu stabilności genomu, projektowania terapii przeciwnowotworowych i chorób genetycznych.

Spośród wielu różnych rodzajów uszkodzeń DNA najgroźniejsze dla zachowania ciągłości genomu są dwuniciowe pęknięcia DNA (DSB), mimo że stanowią one niewielki odsetek wszystkich rodzajów uszkodzeń nieustannie indukowanych w komórce. Mechanizmy naprawy tych uszkodzeń wciąż są intensywnie badane i do dziś nie ma jasnych konkluzji dotyczących systemu aktywacji ścieżek naprawczych oraz roli większości białek w kontroli i regulacji tych procesów. Przedmiotem badań opisanych w niniejszej pracy doktorskiej było

białko 53BP1, które zostało określone jako marker naprawy dwuniciowych pęknięć DNA na drodze łączenia niehomologicznych końców (NHEJ). Jako cel postawiono scharakteryzowanie ognisk naprawczych białka 53BP1 powstałych w odpowiedzi komórkowej na uszkodzenia DNA indukowane przez aktywność endonukleazy Cas9 systemu CRISPR typu II lub skupioną wiązką światła laserowego o długości fali z zakresu widzialnego. Metoda CRISPR-Cas9 umożliwiła wygenerowanie klastra dwuniciowych pęknięć DNA w znanych sekwencjach repetytywnych genomu w subtelerowym regionie chromosomu 3 komórek U-2 OS. Natomiast druga metoda indukcji pęknięć DNA przy użyciu skupionej wiązki światła widzialnego pozwoliła na lokalne naświetlenie chromatyny względnie niską dawką energii bez obecności substancji fotouczulających i indukcję niewielkiej liczby pęknięć DNA, głównie obu nici. Detekcję ognisk 53BP1 przeprowadzano z użyciem mikroskopu konfokalnego, dzięki czemu zarejestrowano obrazy pojedynczych komórek w wysokiej rozdzielczości.

W pierwszej kolejności zoptymalizowano dawki energii dla trzech długości fali światła widzialnego: 458 nm, 488 nm oraz 561 nm wymagane do skutecznego wyindukowania dwuniciowych pęknięć DNA, których obecność identyfikowano w sposób pośredni poprzez obserwację zgromadzonego ogniska białka 53BP1 w naświetlanym miejscu w komórkach HeLa. Badania pokazały, że już niewielka dawka energii światła niebieskiego (458 nm i 488 nm), odpowiednio  $> 25 \mu\text{J}$  i  $90 \mu\text{J}$  jest wystarczająca, aby obserwować gromadzenie się białka 53BP1 w ciągu kilku minut. Z kolei światło zielone (561 nm), aby uzyskać ten sam efekt, wymaga dostarczenia ponad 200 razy większej dawki energii wynoszącej  $20\,000 \mu\text{J}$ . Wykazano również, że indukcja uszkodzenia nie zależy od strumienia fotonów, lecz od całkowitej dawki energii dostarczonej do wybranego miejsca w jądrze komórkowym.

Następnie obliczono powierzchnie maksymalnych przekrojów ognisk naprawczych indukowanych światłem widzialnym, która waha się średnio między  $2$  a  $4,5 \mu\text{m}^2$ , z czego największe ogniska obserwowano po naświetleniu chromatyny wiązką światła laserowego o długości fali 488 nm. Z kolei, ogniska naprawcze powstałe w odpowiedzi na DSB indukowane endonukleazą Cas9 w komórkach U-2 OS w maksymalnym przekroju zajmowały znacznie mniejszą powierzchnię – średnio między  $0,75$  a  $1,2 \mu\text{m}^2$ , choć rejestrowane były również przypadki większych ognisk 53BP1 o powierzchni ok.  $3,5 \mu\text{m}^2$ .

Zaskakującą obserwacją dokonaną podczas obrazowania komórek kontrolnych z nieaktywną endonukleazą dCas9 było znalezienie niewielkiego odsetka komórek, w których zarejestrowano kolokalizację sygnału pochodzącego z białka 53BP1 i innych markerów naprawy DSB ( $\gamma\text{H2A.X}$  i BRCA1) z sygnałem dCas9. Ciekawe jest również to, że zazwyczaj współwystępowanie tych sygnałów dotyczyło tylko jednego ogniska dCas9.



Korelacja przestrzenna aktywnej endonukleazy Cas9 i białka 53BP1, czyli współwystępowanie sygnałów pochodzących z ognisk obu tych białek, została wyznaczona jako liczba zdarzeń, w których maksima intensywności ognisk były oddalone od siebie na odległość nie większą niż 1  $\mu\text{m}$ . Było to możliwe do wykonania dzięki algorytmowi obliczeniowemu opracowanemu w Zakładzie Biofizyki Komórki UJ. Analiza odległości między maksimami intensywności fluorescencji sygnałów pochodzących od Cas9 i 53BP1 wykazała, że średnio 3,6 na 12 ognisk endonukleazy występuje w odległości do 1  $\mu\text{m}$  od białka naprawczego. Obserwowano również zwiększoną, niż liczba potencjalnych miejsc docelowych dla systemu CRISPR, liczbę ognisk Cas9, które cechują się różnorodną intensywnością sygnału i są rozproszone w objętości jądra komórkowego. Dokonano również podobnej analizy w komórkach, do których wprowadzono jednocześnie dwie nikazy Cas9n, które indukują jednoniciowe pęknięcie DNA na przeciwległych niciach. Okazało się, że liczba ognisk nikaz odpowiada średniej liczbie miejsc docelowych (odpowiadającej średniej liczbie chromosomów 3 w genomie), z czego sygnały średnio 2,5 ognisk z 4 koreluje z sygnałem 53BP1. Co ciekawe, zaobserwowano również mniejszą liczbę ognisk 53BP1 niekorelujących przestrzennie z sygnałem nikaz Cas9n.

Dokonano również jednoczesnej obserwacji sygnałów pochodzących z systemu CRISPR-Cas9 oraz 53BP1 i BRCA1, 53BP1 i PML oraz BRCA1 i PML. Okazuje się, że sygnały 53BP1 i BRCA1 oraz 53BP1 i PML często współwystępują w sąsiedztwie ogniska endonukleazy, a BRCA1 i PML nie wykazują bezpośredniego przylegania tych sygnałów mimo niewielkich odległości między nimi i ich nieprzypadkowej lokalizacji w pobliżu Cas9n. Prawdopodobnie 53BP1, jako że tworzy największe ogniska w otoczeniu uszkodzeń DNA, jest głównym składnikiem ogniska naprawczego i stanowi rusztowanie molekularne dla innych czynników naprawczych. Ponadto, profile intensywności ognisk 53BP1 pokazują, że największe zagęszczenie sygnału od 53BP1 znajduje się bliżej ognisk endonukleazy, co może świadczyć o tym, że wymagana jest pewna minimalna liczba cząsteczek 53BP1, która musi być zgromadzona w miejscu przylegającym do uszkodzenia, a inne mogą stanowić frakcję białka mniej związanego z ogniskiem.

*Julie Wroble*