

hab. Adriana Magalska

Warszawa 27.10.2023

Pracownia Epigenetyki Przestrzennej

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

Pani **mgr Julity Wesołowskiej**

Pt. „Charakterystyka ognisk naprawczych 53BP1 we wczesnej odpowiedzi na klaster dwuniciowych pęknięć DNA indukowanych metodą CRISPR-Cas9 lub światłem widzialnym”. Wykonanej pod kierunkiem Prof. dr hab. Jerzego Dobruckiego (promotor) i Dr. Mirosława Zarębskiego (promotor pomocniczy) w Zakładzie Biofizyki Komórki, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Zespół Prof. Dobruckiego od lat zajmuje się opracowywaniem nowych metod badawczych wykorzystujących między innymi mikroskopię optyczną w celu wywoływania uszkodzeń DNA w wybranym miejscu jądra komórkowego czy konkretnej sekwencji zasad DNA, a także metod detekcji tych uszkodzeń w żywych komórkach. W nurt tych badań doskonale wpisuje się przedstawiona mi do recenzji praca mgr Wesołowskiej, której celem było scharakteryzowanie ognisk naprawczych białka 53BP1 powstałych w odpowiedzi komórkowej na uszkodzenia DNA indukowanych przez aktywność endonukleazy Cas9 systemu CRISPR typu II lub skupioną wiązką światła laserowego o długości fali z zakresu widzialnego.

Rozprawa mgr Julii Wesołowskiej przygotowana w języku polskim, jest zorganizowana w klasycznym układzie, z podziałem na główne części obejmujące: Wykaz stosowanych skrótów, wstęp teoretyczny, przedstawienie celu pracy, opis materiałów i metod używanych do realizacji projektu, opis uzyskanych przez doktorantkę wyników, ich dyskusję i płynące z nich wnioski, oraz biografię liczącą 178 pozycji literaturowych, zamykająca całość. Dysertacja zawiera obowiązkowe streszczenia napisane w języku polskim i angielskim, które doskonale podsumowują tematykę, cele badań oraz główne wyniki projektu. Praca składa się z 120 stron i jest ilustrowana pięcioma tabelami oraz trzydziestoma rycinami, z czego dwadzieścia cztery przedstawia wyniki. W ramach pracy dołączono płytę CD zawierającą plik

PDF z rozprawą oraz dwa załączniki zawierające filmy, które stanowią integralną część opisanych wyników.

WSTĘP pracy napisany z dużym rozmachem i dobrze poparty danymi literaturowymi opisuje dotychczasową wiedzę na temat mechanizmów powstawania i naprawy dwuniciowych pęknięć DNA oraz białek w nie zaangażowanych, ze szczególnym uwzględnieniem białek 53BP1 i BRCA-1. Jest to wiedza niezwykle rozległa, dlatego chciałabym szczególnie pochwalić autorkę za bardzo ładny, ciekawy, drobiazgowy, ale nie przeładowany opis wyżej wspomnianych procesów i białek. Jedyne czego mi zabrakło w tej części pracy była rycina, która schematycznie podsumowałaby opisane procesy naprawy. W dodatkowym podrozdziale wstępu opisano stosowane metody indukcji uszkodzeń DNA w badaniach biologicznych wraz z ich zaletami i wadami. Podrozdział ten pozwolił mi na pełniejsze zrozumienie szczegółowych celów pracy, zaplanowanych eksperymentów i uzyskanych wyników.

Główne CELE PRACY, którymi były: 1) Zbadanie różnic w architekturze ognisk tworzonych przez białko 53BP1 w odpowiedzi na uszkodzenia DNA poddawanego lokalnemu naświetlaniu skupioną wiązką światła widzialnego lub wygenerowanych w znanej, ściśle zdefiniowanej sekwencji genomu na chromosomie 3, systemem CRISPR/Cas9, 2) sprawdzenie czy uszkodzenia DNA indukowane systemem CRISPR/Cas9 uruchamiają zawsze jeden typ ścieżki naprawczej – na drodze łączenia niehomologicznych końców DNA lub rekombinacji homologicznej, niezależnie od fazy cyklu komórkowego, 3) zbadanie, czy istnieją różnice w preferowanej przez komórkę ścieżce naprawczej DNA uszkodzonego przy pomocy endonukleazy Cas9 i w przypadku jednoczesnego działania pary nikaz Cas9n, 4) sprawdzenie, czy ogniskom 53BP1 powstałym w sąsiedztwie Cas9 towarzyszą ogniska białka PML i innych czynników naprawczych, zostały jasno sformułowane i przedstawiają plan badań przedstawionych wyników.

W podrozdziale MATERIAŁY opisano wykorzystywane linie komórkowe, szczepy bakteryjne i w postaci tabeli użyte wektory plazmidowe wraz z ich modyfikacjami. W dalszej części w kolejnej tabeli przedstawiono pożywki, odczynniki i roztwory do hodowli komórkowych i wykaz stosowanych przeciwciał pierwszo- i drugo-rzędowych. W podrozdziale METODY opisano hodowle *in vitro* komórek HeLa i U-2 OS, metody ich transfekcji, barwień immunofluorescencyjnych, namnażania i oczyszczania wektorów plazmidowych, a także metody obrazowania, indukcji uszkodzeń DNA z wykorzystaniem mikroskopii optycznej i analizy obrazów danych mikroskopowych.

Opis WYNIKÓW otwiera krótki opis białka 53BP1, które w dalszej części tego rozdziału jest głównym markerem dwuniciowych pęknięć DNA. Do indukcji pęknięć DNA przy użyciu skupionej wiązki światła widzialnego wykorzystano trzy długości fali światła widzialnego: 458 nm, 488 nm oraz 561 nm. Metoda polegała na lokalnym naświetleniu chromatyny żywych komórek niską dawką energii bez obecności substancji fotouczulających. Detekcję dwuniciowych pęknięć DNA przeprowadzono pośrednio przez obserwację powstawania ognisk 53BP1 z użyciem mikroskopu konfokalnego, w żywych lub utrwalonych komórkach. Badania pokazały, że do uzyskania podobnej wydajności powstawania ognisk białka 53BP1 wymagana jest znacznie niższa dawka energii światła niebieskiego (18 μ J dla światła o długości fali 458 nm i 90 μ J, dla 488 nm), niż w przypadku wykorzystania światła zielonego o długości fali 561 nm, dla którego wymagana była dawka 2 mJ. Do tej części wyników mam kilka pytań. Dane jakościowe poparte były danymi ilościowymi (Ryc. 7 i 8), jednakże nie znalazłam nigdzie informacji, ile różnych hodowli i komórek przebadano? Na rycinie 6 w panelu 1D i 2D widocznych jest kilka drobnych skupisk białka 53BP1, które potem tworzą jedno większe foci (czasem z mikrosatelitą). Czy na pierwszym etapie możemy zobaczyć rzeczywistą liczbę pęknięć, których w późniejszym etapie nie można już rozróżnić ze względu na nagromadzenie się znakowanego białka 53BP1 i ograniczenie w postaci rozdzielczości użytej do obrazowania metody? Zastanawiały mnie również ogniska 53BP1 poza naświetlanym obszarem (np. Ryc. 5 panel 2A i 2C, Ryc. 6 panel 1B). Czy zbadano, ile ich występuje w kontrolnych, nienaświetlanych komórkach? Jaka może być przyczyna ich występowania?

Do uzyskania uszkodzeń DNA w kolejnej części wyników wykorzystano metodę CRISPR-Cas9 umożliwiającą wygenerowanie pęknięć DNA w konkretnej sekwencji DNA, która w przedstawionej pracy zlokalizowana była w subtelomerowym regionie ludzkiego chromosomu 3. Dzięki zastosowaniu znakowanego fluorescencyjnie białka Cas9 możliwa była obserwacja miejsc wiązania i działania endonukleazy. Obliczano korelację przestrzenną ognisk Cas9 i 53BP1, sprawdzając, ile z nich znajduje się w odległości poniżej i powyżej 1 μ m odległości od siebie. Chciałabym zapytać czym podyktowane było przyjęcie takiej granicy? Wykazano, że średnio 3,6 na 12 ognisk endonukleazy występuje w odległości do 1 μ m od białka naprawczego. Czy możliwe, że w pozostałych miejscach białka naprawcze występują w tak niskim stężeniu, że nie jest możliwa ich detekcja? Może ze względu na silne upakowanie sekwencji powtarzalnych w regionie subtelomerowym dostępność do uszkodzenia dla białek naprawczych jest ograniczona? Chciałabym także dowiedzieć się, czy sprawdzano specyficzność wiązania Cas9 do chromosomu 3 za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* z sondą komplementarną do terytorium chromosomowego ludzkiego chromosomu 3?

Podobna analiza została przeprowadzona w układzie, w którym do komórek wprowadzono jednocześnie dwie nikazy Cas9n indukujące jednoniciowe pęknięcia DNA na przeciwległych niciach. W

tym przypadku średnio 2,5 ognisk Cas9n korelowała z sygnałem 53BP1, a liczba foci Cas9n odpowiadała średniej liczbie miejsc docelowych, czyli 4 kopii chromosomu 3, co świadczyłoby o większej specyficzności takiego układu.

W dalszej części wyników obliczono powierzchnię maksymalnych przekrojów ognisk naprawczych indukowanych światłem widzialnym i metodą CRISPR-Cas9. W odpowiedzi na naświetlanie chromatyny wielkość ognisk białka 53BP1 wahała się średnio między 2 a 4,5 μm^2 , a w przypadku uszkodzeń indukowanych endonukleazą Cas9 ogniska zajmowały znacznie mniejszą powierzchnię – średnio między 0,75 a 1,2 μm^2 . Chciałabym dowiedzieć się czy zaobserwowane różnice nie wynikają z przestrzennej budowy powstających ognisk naprawy. W przypadku naświetlania promień lasera skoncentrowany jest na jakiejś konkretnej objętości chromatyny, podczas gdy endonukleaza wiąże się w wielu miejscach, ale na bardzo małym odcinku DNA (ok. 35 kb), które znajduje się na dodatek w rejonie o silnym upakowaniu. Dla porównania badane przez Trzaskomę i wsp. (Trzaskoma i wsp. 2020) 1 Mb domeny chromatynowe miały przekrój około 3 μm^2 . W jaki sposób wielkość ognisk indukowanych światłem widzialnym korelowała z wielkością naświetlanego ROI?

Na koniec zbadano współwystępowanie sygnałów pochodzących z systemu CRISPR-Cas9 oraz 53BP1 i białek BRCA-1 i PML. Wyniki jakościowe wskazywały na korelację przestrzenną ognisk endonukleazy z sygnałami białek 53BP1 i BRCA-1 oraz 53BP1 i PML. Jednakże nie zaobserwowano bezpośredniego przylegania sygnałów BRCA-1 i PML pomimo ich specyficznej lokalizacji w pobliżu endonukleazy.

Bardzo ciekawymi według mnie obserwacjami dokonаныmi w komórkach z różnymi wersjami systemu CRISPR-Cas9, był niewielki odsetek komórek, w których nieaktywna forma endonukleazy dCas9 współwystępowała ona z białkiem 53BP1 i innymi markerami naprawy dwuniciowych pęknięć DNA jak $\gamma\text{H2A.X}$ i BRCA-1. Dodatkowo kolokalizacja ta dotyczyła tylko jednego z czterech ognisk dCas9. Ponadto w niektórych komórkach długotrwała ekspresja aktywnej endonukleazy Cas9 prowadziła do całkowitego odcięcia fragmentu chromosomu, a także do powstawania aberracji chromosomowych w postaci mostków chromosomowych i mikrojąder. Nie znalazłam jednak informacji jak częste były to zjawiska, czy zrobiono ich ilościową analizę? Komórki linii nowotworowych często wykazują zaburzenia mitozy, ciekawi mnie więc na ile była to wina ekspresji białek i działania systemu CRISPR-Cas9.

W rozdziale DYSKUSJA doktorantka umiejętnie konfrontuje uzyskane przez siebie wyniki z danymi literaturowymi i niepublikowanymi wynikami innych członków zespołu Prof. Dobruckiego. W sposób bardzo dojrzały dyskutuje zastosowane przez siebie metody rozważając ich strony pozytywne i ograniczenia, które w zwięzły sposób podsumowane zostały w tabeli 5. Uważam, że Dyskusja, obok Wstępu to najmocniejsze i bardzo ciekawe części tej rozprawy, które pokazują szeroką wiedzę i

dojrzałość naukową doktorantki, a także talent do przekazywania wiedzy w zrozumiałym, ustrukturyzowanym i nieprzeładowanym szczegółami i naukowym żargonem sposób.

Rozprawa zakończona jest bardzo krótkim podsumowaniem i wnioskami płynącymi z uzyskanych wyników i wskazuje możliwości kontynuowania przeprowadzonych badań.

W powyższej ocenie przedstawiłam pytania, uwagi i komentarze, niemniej uważam, że rozprawa potwierdza ogromną wiedzę teoretyczną doktorantki. Z pewnością pokazuje też jej umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych i dyskusji uzyskanych wyników.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Julity Wesołowskiej spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. Zm). Zwracam się wnioskiem do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Julity Wesołowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora *w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.*

Dr hab. Adriana Magalska

