

UNIwersytet  
MIKOŁAJA KOPERNIKA  
W TORUNIU  
Wydział Lekarski  
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Katedra Histologii i Embriologii  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu  
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy  
ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz  
tel. 52 585 37 25

Bydgoszcz, dn. 02.08.2023 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej pt. „Charakterystyka ognisk naprawczych 53BP1 we wczesnej odpowiedzi na klaster dwuniciowych pęknięć DNA indukowanych metodą CRISPR-Cas9 lub światłem widzialnym”**

**autorstwa mgr Julity Wesołowskiej**

realizowanej w

Zakładzie Biofizyki Komórki  
Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii  
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

**promotor: prof. dr hab. Jerzy Dobrucki**

**promotor pomocniczy: dr Mirosław Zarębski**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska pt. „Charakterystyka ognisk naprawczych 53BP1 we wczesnej odpowiedzi na klaster dwuniciowych pęknięć DNA indukowanych metodą CRISPR-Cas9 lub światłem widzialnym” porusza niezwykle ciekawe merytorycznie i potrzebne zagadnienia dotyczące procesów naprawy DNA oraz organizacji przestrzennej tych procesów. Na uwagę zasługuje wykorzystanie w przeprowadzonych badaniach technologii CRISPR – systemu, którego odkrycie i możliwość aplikacji w komórkach eukariotycznych zrewolucjonizowało współczesną inżynierię genetyczną.

Rozprawa autorstwa mgr Julity Wesołowskiej ma typowy i właściwy układ dla rozprawy na stopień doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Obejmuje 120 stron maszynopisu oraz płytę z wersją elektroniczną rozprawy i dwoma załącznikami w formacie .avi, stanowiącymi poklatkowe filmy prezentujące przyżyciowe obserwacje komórek na poziomie mikroskopu konfokalnego. W tym kontekście, zwracam uwagę na konieczność stosowania odpowiedniej kompresji filmów, aby możliwe było ich otwarcie na szerokiej gamie urządzeń wyposażonych w odmienne systemy operacyjne, szczególnie przez osoby niezajmujące się na co dzień obróbką sekwencji utworzonych ze zdjęć



mikroskopowych. Rozprawa została podzielona na następujące rozdziały: „Wstęp”, „Cel pracy”, „Materiały i metody”, „Wyniki” i „Dyskusja”. Rozprawa została poprzedzona obszernym „Wykazem skrótów” i „Streszczeniem” w języku polskim i angielskim, a zakończona „Spisem rycin i tabel oraz załączników” oraz „Literaturą”.

Sposób edycji pracy nie budzi większych zastrzeżeń. Odnotowałem bardzo niewiele błędów literowych i stylistycznych. Z obowiązku recenzenta wskazuję jednak brak jasno sformułowanych wniosków wynikających z przeprowadzonych badań w formie osobnego rozdziału pracy. Jednakże sposób przedstawienia treści oraz forma zachowania logicznego postępowania badawczego zasługują na uznanie.

Wstęp do pracy obejmuje swoim zakresem obszerne następujące podrozdziały: „Dwuniciowe pęknięcia DNA i ich wpływ na aktywność komórki”, „Mechanizmy naprawy dwuniciowych pęknięć DNA” (w tym „Łączenie niehomologicznych zakończeń DNA i ścieżki alternatywne” i „Rekombinacja homologiczna”), „Białka rozpoznawcze i ich rola w regulacji ścieżek naprawczych” (w tym „53BP1 i jego partnerzy molekularni w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA” i „BRCA1 i jego rola w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA”), „Indukcja uszkodzeń DNA w badaniach biologicznych” (w tym „Lokalne naświetlanie chromatyny skupioną wiązką światła laserowego” i „Molekularne nożyczki – metoda CRISPR-Cas9”). Zagadnia wprowadzające w część doświadczalną pracy zostały opatrzone tabelą przedstawiającą zestawienie najważniejszych informacji o głównych i alternatywnych ścieżkach naprawy dwuniciowych pęknięć DNA oraz rycinami prezentującymi aktywację ścieżek naprawczych w kontekście fazy cyklu komórkowego oraz domeny strukturalne 53BP1 i funkcjonalne BRCA1 ze wskazaniem ich oddziaływań z innymi czynnikami naprawczymi. Warto byłoby graficznie przedstawić działanie systemów CRISPR wykorzystywanych w badaniach będących przedmiotem niniejszej rozprawy.

Cele badawcze podjętych badań dotyczyły określenia: czy (1) istnieją różnice w architekturze ognisk tworzonych przez białko 53BP1 w odpowiedzi na: (a) klaster uszkodzeń DNA w objętości chromatyny poddawanej lokalnemu naświetlaniu skupioną wiązką światła widzialnego oraz (b) klaster uszkodzeń DNA wygenerowanych w znanej, ściśle zdefiniowanej sekwencji genomu na chromosomie 3, która jest rozpoznawana i enzymatycznie przecinana przez endonukleazę Cas9; czy (2) 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; czy (3) istnieją różnice w preferowanej przez komórkę ścieżce naprawczej DNA uszkodzonego przy pomocy endonukleazy Cas9 i w przypadku jednoczesnego działania pary nukaz Cas9n; czy (4) ogniskom 53BP1 powstałym w sąsiedztwie Cas9 towarzyszą ogniska białka PML i innych czynników naprawczych.

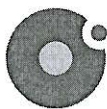
Rozprawa doktorska mgr Julity Wesołowskiej została bardzo dobrze zaplanowana, a dobrane przez Doktorantkę techniki badawcze zostały bardzo szczegółowo opisane w rozdziale „Materiały i metody” i pozwoliły na realizację wszystkich szczegółowych celów badawczych. W kontekście opisu metod, Doktorantka nie przedstawiła sposobu i warunków utrwalania komórek, choć informacja o formaldehydzie i jego 4% roztworze roboczym znalazła się w sekcji „Odczynniki stosowane do barwienia immunofluorescencyjnego” tabeli nr 3 pn. „Lista odczynników wykorzystywanych w hodowlach komórkowych i barwieniach immunofluorescencyjnych”. Doktorantka pominęła również kwestię ilościowej suplementacji medium hodowlanego DMEM/F-12 wodorowęglanem sodu przy opisie przyżyciowego obrazowania komórek pod mikroskopem konfokalnym. Nie mniej jednak bardzo wysoko oceniam świadomość metodologiczną mgr Julity Wesołowskiej, co znajduje potwierdzenie w wielokrotnie podkreślanych w tekście rozprawy ograniczeniach aparaturowych lub metodologicznych.

Badania podjęte przez Doktorantkę zostały opisane w rozdziale „Wyniki”. Opis wyników został poparty czytelnymi rycinami prezentującymi m.in. zestawienia obrazów mikroskopowych, wykresy czy schemat eksperymentu. W pierwszej fazie przeprowadzonych badań, Doktorantka zoptymalizowała dawki energii dla trzech długości fali światła widzialnego: 458 nm, 488 nm oraz 561 nm, które wymagane są do skutecznej indukcji dwuniciowych pęknięć DNA zidentyfikowanych poprzez obserwację zgromadzonego ogniska białka 53BP1 w naświetlanym miejscu w komórkach HeLa. Badania pokazały, że już niewielka dawka energii światła niebieskiego (o długości fali 458 nm i 488 nm),  $> 25 \mu\text{J}$  i  $90 \mu\text{J}$ , jest wystarczająca, aby zaobserwować gromadzenie się białka 53BP1 w przeciągu kilku minut. Z kolei światło zielone (o długości fali 561 nm) wymagało dostarczenia dawki energii wynoszącej  $20\,000 \mu\text{J}$ . Badania wykazały, że indukcja uszkodzenia nie zależy od strumienia fotonów, ale od całkowitej dawki energii dostarczonej do wybranego miejsca w jądrze



komórkowym. Kolejnym krokiem było obliczenie powierzchni maksymalnych przekrojów ognisk naprawczych indukowanych światłem widzialnym. Powierzchnie te mieściły się w przedziale 2 a 4,5  $\mu\text{m}^2$ , a największe ogniska zostały zaobserwowane po naświetleniu chromatyny wiązką światła laserowego o długości fali 488 nm. Ogniska naprawcze powstałe w odpowiedzi na działanie Cas9 w komórkach U-2 OS w maksymalnym przekroju zajmowały znacznie mniejszą powierzchnię (średnio pomiędzy 0,75 a 1,2  $\mu\text{m}^2$ , jednakże odnotowano także przypadki większych ognisk 53BP1 o powierzchni nawet bliskiej 3,5  $\mu\text{m}^2$ ). Ciekawym jest, że podczas obrazowania komórek kontrolnych z nieaktywną endonukleazą dCas9, Doktorantka zaobserwowała niewielki odsetek komórek, w których kolokalizowano sygnał pochodzący z białka 53BP1 i innych markerów naprawy pęknięć dwuniciowych pęknięć DNA ( $\gamma\text{H2A.X}$  i BRCA1) z sygnałem dCas9. Dotyczyło najczęściej tylko jednego ogniska dCas9. Analiza odległości między maksimami intensywności fluorescencji sygnałów pochodzących od Cas9 i 53BP1 wykazała, że średnio 3,6 na 12 ognisk endonukleazy występowało w odległości do 1  $\mu\text{m}$  od białka naprawczego. Interesującym jest, że Doktorantka obserwowała zwiększoną niż liczba potencjalnych miejsc docelowych dla systemu CRISPR liczbę ognisk Cas9. Podobną analizę wykonano na komórkach, do których wprowadzono jednocześnie dwie nikazy Cas9n, które indukują jednoniciowe pęknięcia DNA na przeciwnych niciach. W tym przypadku liczba ognisk Cas9n odpowiadała średniej liczbie miejsc docelowych, z czego sygnały średnio 2,5 ognisk z 4 korelowało z sygnałem 53BP1. Doktorantka zaobserwowała również mniejszą liczbę ognisk 53BP1 niekorelujących przestrzennie z sygnałem Cas9n. Dokonano również jednoczesnej obserwacji sygnałów pochodzących z systemu CRISPR oraz 53BP1 i BRCA1, 53BP1 i PML oraz BRCA1 i PML, wykazując, że sygnały 53BP1 i BRCA1 oraz 53BP1 i PML współwystępują w sąsiedztwie ogniska endonukleazy, a BRCA1 i PML nie wykazują bezpośredniego przylegania, nawet pomimo niewielkich odległości między nimi i lokalizacji w pobliżu Cas9n. Bardzo wysoko oceniam tok badawczy i jakość przedstawiania i opisu wyników. Po raz kolejny zwracam uwagę na bardzo dużą świadomość Doktorantki o ograniczeniach metodologicznych. W kontekście oznaczeń trajektorii odciętego i nieodciętego ogniska interesującym i zasadnym wydałaby się ocena kierunkowości i prędkości analizowanych elementów.

Otrzymane wyniki zostały omówione przez Doktorantkę w kontekście doniesień literaturowych w rozdziale „Dyskusja”. Rozdział ten został podzielony na następujące



podrozdziały: „Ogniska 53BP1 reprezentują rzeczywiste miejsca uszkodzenia DNA” (w tym „Wykrywanie indywidualnych dwuniciowych pęknięć DNA poprzez obserwację ognisk 53BP1 po naświetleniu chromatyny światłem widzialnym” i „Detekcja dwuniciowych pęknięć DNA za pośrednictwem obserwacji ognisk 53BP1 po indukcji klastra uszkodzeń metodą CRISPR-Cas9”), „Ogniska aktywnej endonukleazy Cas9 a brak współwystępowania sygnału markerów naprawy”, „Architektura ogniska naprawczego oraz jego lokalizacja względem uszkodzenia” (w tym „Architektura ogniska 53BP1 oraz jego lokalizacja względem uszkodzenia przy pomocy światła widzialnego” i „Architektura ogniska 53BP1 oraz jego lokalizacja względem uszkodzenia przy pomocy systemu CRISPR-Cas9”), „Znaczenie białka 53BP1 w naprawie uszkodzeń DNA indukowanych metodą CRISPR-Cas9” oraz „Nowe kierunki badań zmierzających do identyfikacji uruchamianych ścieżek naprawczych dwuniciowych pęknięć DNA”. „Dyskusja” została napisana rzeczowo, merytorycznie i obejmuje najistotniejsze zagadnienia związane z przeprowadzonymi badaniami i zakresem przedmiotowym rozprawy. Sposób konsekwentnego podziału treści świadczy o szerokiej wiedzy i dojrzałości naukowej Doktorantki.

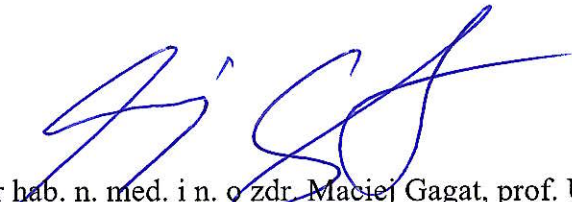
Część merytoryczną „Dyskusji” kończy konkluzja wskazująca, że wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie umożliwiły opis niektórych aspektów funkcjonalnych ognisk 53BP1 w uszkodzeniach DNA indukowanych światłem widzialnym i technologią CRISPR, a kontynuacja badań i próba odpowiedzi na pytania stanowiące cele pracy umożliwią lepsze scharakteryzowanie poszczególnych ścieżek naprawczy DNA.

W podsumowaniu recenzji uważam, że ujęte w rozprawie doktorskiej wyniki są przydatne z punktu widzenia zrozumienia mechanizmów naprawy DNA w kontekście ich organizacji przestrzennej i będą stanowić element wyjściowy do dalszych badań podstawowych próbujących wyjaśnić np. konieczność nagromadzenia się znacznej ilości cząsteczek białka 53BP1 oraz innych białkowych czynników związanych z mechanizmami naprawczymi, niezależnie od liczby indukowanych pęknięć DNA.

Poprzez realizację pracy Doktorantka pokazała, że potrafi samodzielnie prowadzić badania naukowe, korzystać ze współpracy naukowej, a także w pełni wykorzystać dostępny warsztat naukowy. Potrafi również przeprowadzić dyskusję swoich wyników z wynikami innych grup badawczych. Stąd jednoznacznie stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Julity



Wesołowskiej pt. „Charakterystyka ognisk naprawczych 53BP1 we wczesnej odpowiedzi na klaster dwuniciowych pęknięć DNA indukowanych metodą CRISPR-Cas9 lub światłem widzialnym” spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. z 2018 r. poz. 1668, z późn. zm.). Dlatego wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Julity Wesołowskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Ponadto, z uwagi na wysoki charakter poznawczy pracy, jakość przeprowadzonych badań z użyciem zaawansowanych narzędzi badawczych, a także istotność przeprowadzonej analizy w kontekście rozwoju nauki, wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o wyróżnienie rozprawy doktorskiej autorstwa mgr Julity Wesołowskiej.



dr hab. n. med. i n. o zdr. Maciej Gagat, prof. UMK