

Laboratory of Bioinformatics and Computational Genomics LB!GO
Faculty of Mathematics and Information Science, Warsaw University of Technology
ul. Koszykowa 75, 00-662 Warsaw, Poland

Warszawa,
10.10.2023

Laboratory of Functional and Structural Genomics LFSG
Centre of New Technologies, University of Warsaw
Banacha 2c Street, 02-097 Warsaw, Poland

mobile: [+48504726203](tel:+48504726203), e-mail: Dariusz.Plewczynski@pw.edu.pl, www: <https://plewczynski-lab.org>

Warsaw, 10/10/2023

Prof. dr hab. Dariusz Plewczyński
Laboratory of Bioinformatics and Computational Genomics,
Faculty of Mathematics and Information Science,
Warsaw University of Technology
Laboratory of Functional and Structural Genomics
Centre of New Technologies
University of Warsaw

Recenzja Rozprawy Doktorskiej
mgr Julity Wesółowskiej

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

wykonanej w Zakładzie Biofizyki Komórki
na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

pod kierunkiem promotorów
profesora doktora habilitowanego Jerzego Dobruckiego
oraz
doktora Mirosława Zarębskiego

zgłoszonej do Rady Dyscypliny Naukowej
Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Jagiellońskiego

Genom ludzki składa się z około 3 miliardów par zasad DNA, które są gęsto upakowane w 23 pary chromosomów (łącznie 46 chromosomów). Sekwencja DNA zawiera około 20 000 - 25 000 genów, które kodują białka oraz wiele innych regionów regulatorowych. Jeśliby rozciągnąć całe DNA zawarte w pojedynczej komórce ludzkiej, miałoby ono długość około 2 metrów. Pokazuje to skalę problemu wiernego utrzymania tak rozległego magazynu informacji biologicznej, który nie tylko służy jej przechowywaniu, ale też jest aktywnie używany w trakcie życia komórki.

Stabilność genomu jest więc kluczowym aspektem zachowania integralności DNA i zdrowia na poziomie komórkowym i całego organizmu. Komórki muszą sprostać wyzwaniu naprawy tysięcy uszkodzeń DNA spowodowanych czynnikami zarówno endogennymi, jak i egzogennymi, w tym reaktywnymi formami tlenu, wolnymi rodnikami, promieniowaniem UV i chemicznymi mutagenami, etc. Mechanizmy naprawy DNA, zarówno pojedynczej nici (naprawa niesparowanych zasad, naprawa przez wycinanie zasad lub wielu nukleotydów) jak i podwójnej nici DNA (łączenie niehomologicznych zakończeń i rekombinacja homologiczna), są intensywnie wdrażane aby po pierwsze zidentyfikować a następnie naprawiać uszkodzenia obu typów, w celu zachowania ciągłości i wierności sekwencji DNA.

Genom ludzki jest szczególnie podatny na mutacje, które mogą prowadzić do rozwoju chorób, w tym nowotworów. Zaawansowane mechanizmy kontroli wierności, takie jak systemy sprawdzające poprawność replikacji DNA są niezbędne, żeby zminimalizować ryzyko takich zdarzeń, co jest kluczowe dla zachowania funkcji komórki i zapobiegania rozwojowi chorób związanych z mutacjami, takich jak nowotwory. Mimo tych synergicznych mechanizmów obronnych zapewniających stabilność i integralność genomu, mutacje i uszkodzenia DNA występują, co podkreśla złożoność procesów odpowiedzialnych za stabilność genomu.

Dwuniciowe pęknięcia DNA (DSBs) stanowią jeden z najpoważniejszych typów uszkodzeń DNA, które mogą prowadzić do niestabilności genomu i, w konsekwencji, do powstawania mutacji, translokacji chromosomów i aneuploidii. DSBs mogą być wywołane przez różne czynniki, takie jak promieniowanie jonizujące, chemikalia czy stresse metaboliczne, ale również mogą być wynikiem naturalnych procesów biologicznych, jak rekombinacja meiotyczna. Komórki w odpowiedzi na to zagrożenie rozwinęły wyrafinowane mechanizmy naprawy, wśród których najważniejsze to homologiczne łączenie końców (HR) i niehomologiczne łączenie końców (NHEJ). HR wykorzystuje

homologiczną sekwencję DNA jako szablon do dokładnej naprawy DSB, co czyni go bardziej precyzyjnym, ale jest ograniczony do fazy S i G2 cyklu komórkowego, gdy dostępna jest kopia siostrzana. Z kolei NHEJ, który może działać w każdej fazie cyklu komórkowego, łączy bezpośrednio końce DSB, co jednak może prowadzić do małych delecji lub insercji. W ten sposób komórki zachowują integralność i stabilność swojego genomu, choć nie zawsze z pełną dokładnością.

W ramach krajobrazu białek uczestniczących w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA (DSB) białko 53BP1 odgrywa kluczową rolę, działając jako istotny składnik odpowiedzi komórki na uszkodzenie DNA. Jego funkcja jest wielowątkowa: uczestniczy w rekrutacji innych białek naprawczych do miejsca uszkodzenia, moduluje procesy naprawy i uczestniczy w zatrzymywaniu cyklu komórkowego, aby umożliwić naprawę. 53BP1 promuje naprawę DNA przez łączenie niehomologiczne końców (NHEJ), tj. proces, który bezpośrednio łączy końce DSB i jest ważny dla zachowania integralności genomu w sytuacji braku wzorca. Białko to gromadzi się w miejscach DSB, gdzie rozpoznaje i wiąże się z modyfikowanymi histonami i innymi elementami chromatyny, tworząc ogniska naprawcze. Jego aktywność jest regulowana przez inne mechanizmy naprawy DNA, co pozwala na precyzyjne i skoordynowane działanie w odpowiedzi na różne typy uszkodzeń DNA.

Przedstawiona mi do recenzji praca mgr. Julity Wesołowskiej jest skoncentrowana na badaniu komórkowych mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymanie stabilności genomu, co stanowi podstawową cechę zapewniającą przetrwanie komórki i przekazywanie nienaruszonego materiału genetycznego kolejnym pokoleniom. Autorka zagłębia się w badanie szczegółowych mechanizmów uszkodzeń i naprawy DNA, z naciskiem na rolę białka 53BP1 w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA (DSB), jednego z najpoważniejszych typów uszkodzeń DNA. Jest to o tyle istotne, że DSB są odpowiedzialne za wiele patologicznych mutacji charakteryzujących szerokie spektrum chorób obserwowanych w populacji ludzkiej.

Głównym celem badań Wesołowskiej było scharakteryzowanie ognisk naprawczych białka 53BP1 indukowanych sztucznie (kontrolowane doświadczenie) przez uszkodzenia DNA spowodowane aktywnością CRISPR-Cas9 lub skoncentrowanym światłem widzialnym. Przeprowadzone eksperymenty obejmowały optymalizację dawek energii potrzebnych do

indukcji DSB za pomocą światła widzialnego oraz badanie maksymalnych przekrojów poprzecznych ognisk naprawczych.

W myśl wymagań Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. 2017 poz. 1789, z późn. zm.) oraz Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. 2018 poz. 261), jak również art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630), przedmiotem mojej oceny jest oryginalność rozwiązane go problemu naukowego, ogólna wiedza teoretyczna Kandydata w dziedzinie biologii, a także umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Przedmiot mojej oceny, czyli rozprawa doktorska, moim zdaniem jest w pełni zgodny z warunkami określonymi w powyższych Ustawach, a nawet przekracza zwyczajowe wymagania. Autorka prezentuje wyjątkową oryginalność sformułowania i rozwiązania problemu naukowego, szeroką wiedzę teoretyczną z zakresu biologii molekularnej i ewolucyjnej, a także umiejętność prowadzenia wytrwałej i twórczej pracy naukowej. Nie mam żadnych poważnych uwag do rozprawy doktorskiej, jakości przedstawienia metodologii i wyników badań, dorobku publikacyjnego Kandydatki. Całość rozprawy w pełni zasługuje na zaakceptowanie przez Radę Dyscypliny, a nawet jestem przekonany zasługuje na wyróżnienie.

Rozprawa doktorska Pani mgr mgr Julity Wesołowskiej została wykonana w Zakładzie Biofizyki Komórki, na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod kierunkiem promotorów profesora doktora habilitowanego Jerzego Dobruckiego, oraz doktora Mirosława Zarębskiego.

Praca liczy sobie 120 stron wraz z odniesieniami literaturowymi, w tym do artykułów opublikowanych przez zespół w punktowanych czasopismach naukowych. Skupia się na charakterystyce ognisk naprawczych 53BP1 we wczesnej odpowiedzi na dwuniciowe pęknięcia DNA, przy wykorzystaniu metod biologii molekularnej i innych metod z dziedziny biofizyki DNA, ciekawie wykorzystując mechanizm indukcji pęknięć za pomocą CRISPR-Cas9 lub światła widzialnego.

Motywacją do napisania pracy doktorskiej Julity Wesołowskiej była chęć zgłębienia mechanizmów odpowiedzi komórek na uszkodzenia DNA, w szczególności roli białka 53BP1 w kontekście dwuniciowych pęknięć DNA. Badania skoncentrowały się na charakteryzacji ognisk naprawczych 53BP1 i ich roli we wczesnej odpowiedzi na uszkodzenia DNA indukowane za pomocą metody CRISPR-Cas9 oraz światłem widzialnym. Praca miała na celu wizualizację przestrzenną złożonych procesów naprawy DNA, które są kluczowe dla zachowania stabilności genomu. Zrozumienie tych mechanizmów może przyczynić się do rozwoju nowych strategii w diagnozowaniu i leczeniu chorób związanych z uszkodzeniem DNA, w tym raka. Komórki nowotworowe wykazują zaburzenia w mechanizmach naprawy DNA, dlatego też prowadzone badania mogą dostarczyć istotnych informacji niezbędnych do opracowania skutecznych terapii przeciwnowotworowych i głębszego zrozumienia mechanizmów odporności na już stosowane terapie w klinikach.

Lista prac naukowych opublikowanych z promotorem przez Doktorantkę w trakcie prac nad doktoratem obejmuje jedną, kluczową pozycję powiązaną z tematyką pracy doktorskiej co spełnia formalne wymagania określające minimalną liczbę publikacji przy złożeniu rozprawy doktorskiej. Poniżej informacje bibliometryczne o powyższej publikacji związanej z doktoratem:

- [P1] Zarębski M, Bosire R, **Wesołowska J**, Szelest O, Eatmann A, Jasińska-Konior K, Kepp O, Kroemer G, Szabo G, Dobrucki JW. (2021) *Translocation of chromatin proteins to nucleoli-The influence of protein dynamics on post-fixation localization.* **Cytometry A.** 2021 Dec;99(12):1230-1239. doi: 10.1002/cyto.a.24464. Epub 2021 Jun 10. PMID: 34110091

Publikacja porusza ciekawy temat potencjalnych rozbieżności między lokalizacją białek w jądrach żywych komórek a ich obserwowanymi pozycjami po utrwaleniu. Autorzy odkryli, że architektoniczne białka jądrowe, takie jak HMGB1 i H1, mogą zmieniać lokalizację podczas procesu utrwalania. Podczas gdy zwykle są one związane z chromatyną, utrwalenie może prowadzić do ich przeniesienia do jąderka. Takiego zjawiska nie obserwuje się u bardziej stabilnie związanych z DNA białek, jak histon H2B, czy inne histony. Autorzy publikacji przypisują to przeniesienie zmianom w strukturze DNA podczas utrwalania, a także słabszemu wiązaniu się bardziej dynamicznych (mobilnych) białek architektonicznych z DNA. Uzyskane wyniki podkreślają znaczenie uwzględnienia dynamiki białek podczas interpretacji danych z komórek utrwalonych.

Odlączenie dynamicznych białek od chromatyny może być również indukowane w komórkach już utrwalonych metodami nieusieciowanymi, gdy struktura DNA jest zniekształcona przez cząsteczki interkalujące. Białka przeniesione podczas utrwalania z chromatyny do jąder wiążą się tam ze strukturami zawierającymi RNA, co może prowadzić do błędnej interpretacji otrzymanych wyników.

Przejdę teraz do omówienia samej pracy doktorskiej.

Autorka skupia w niej na dwuniciowych pęknięciach DNA (DSB), w szczególności takich które są naprawiane przez białko 53BP1 poprzez łączenie niehomologicznych końców DNA (NHEJ). Badania doktorantki miały na celu scharakteryzowanie ognisk naprawczych 53BP1 w odpowiedzi na uszkodzenia DNA indukowane przez CRISPR-Cas9 oraz światło widzialne. Wstępne wyniki wykazały, że indukcja uszkodzeń DNA zależy od całkowitej dostarczonej dawki energii, a nie od strumienia fotonów; różne długości fal świetlnych wymagają różnych dawek energii do indukcji widocznej akumulacji 53BP1.

W swoich badaniach mgr Julina Wesołowska zaobserwowała również kolokalizację 53BP1 i innych markerów naprawy DSB z nieaktywnym dCas9, co wskazuje na ich potencjalne pośrednie lub bezpośrednie interakcje fizyczne między tymi białkami. Przeanalizowano przestrzenną korelację między aktywnym Cas9 i 53BP1, potwierdzając ich współwystępowanie w niektórych przypadkach. Jednoczesna obserwacja sygnałów z CRISPR-Cas9 i par białek wykazała częste współwystępowanie w pobliżu ognisk endonukleazy, co sugeruje znaczącą rolę 53BP1 w ogniskach naprawczych.

Badania doktorantki umożliwiły wgląd w mechanizmy komórkowe stojące za naprawą DNA i stabilnością genomu, co w opinii recenzenta może mieć znaczący wpływ na zrozumienie onkogenezy oraz chorób genetycznych.

Rozdział pierwszy zawiera wykaz skrótów użyty w pracy. Rozdział drugi to streszczenie w języku polskim. Rozdział trzeci zawiera szczegółowe streszczenie w języku angielskim. Rozdział czwarty stanowi wstęp w tematykę doktoratu, opisując podstawowe pojęcia, mechanizmy molekularne czy zagadnienia metodologiczne. Rozdział piąty opisuje bardzo skrótowo cele pracy. Rozdziały szósty skupia się na opisanu materiałów i metodologii pracy. Rozdział siódmy zawiera uzyskane przez doktorantkę wyniki, zaś rozdział ósmy stanowi prawie 13 stronicowa dyskusja zawiera kluczowe wnioski z rozprawy. Ostatnie dwa rozdziały to spis rycin, tabel i załączników oraz literatura przedmiotu.

We wprowadzeniu doktorantka skupia się na przedstawieniu mechanizmów komórkowych, które zapewniają replikację i naprawę DNA, dodatkowo utrzymując integralność i stabilność genomu, co jest kluczowe dla prawidłowych funkcji komórkowych. Autorka zwraca uwagę na wysoką precyzję i czułość tych procesów, wspomaganych przez dodatkowe mechanizmy molekularne monitorujące ich poprawność. Złożona maszyna naprawcza angażuje wiele białek enzymatycznych i nieenzymatycznych, wykrywa i oznacza miejsca uszkodzeń DNA, wprowadza modyfikacje po-translacyjne białek chromatynowych. Te białka umożliwiają kondensację i relaksację chromatyny wokół miejsca uszkodzenia, inicjują kaskadę sygnalizacyjną, która umożliwia rekrutację dodatkowych czynników naprawczych i prowadzi do re-ligacji, czyli ponownego łączenia przerwanych końców nici DNA. Autorka omawia obecną wiedzę na temat dwuniciowych pęknięć DNA, mechanizmów naprawczych oraz metod ich badania. Rozdział czwarty stanowi bardziej szczegółowe rozwinięcie wstępu skupiając się na wpływie dwuniciowych pęknięć DNA na aktywność komórkową, mechanizmach naprawy dwuniciowych pęknięć DNA, roli białek rozpoznawczych w regulacji ścieżek naprawczych oraz na metodach indukcji uszkodzeń DNA stosowanych w badaniach biologicznych.

Celem pracy doktorantki było zbadanie architektury ognisk tworzonych przez białko 53BP1 w odpowiedzi na różne typy uszkodzeń DNA: indukowanych lokalnym naświetlaniem skupioną wiązką światła widzialnego oraz wygenerowanych przez endonukleazę Cas9 w miejscu występowania określonej sekwencji genomu. Pani Magister zamierzała ustalić, czy uszkodzenia DNA indukowane systemem CRISPR/Cas9 zawsze uruchamiają jeden typ ścieżki naprawczej, niezależnie od fazy cyklu komórkowego. Praca miała na celu również zrozumienie, czy istnieją różnice w preferowanej ścieżce naprawczej DNA uszkodzonego przez endonukleazę Cas9 w porównaniu z działaniem pary nukleaz Cas9n, oraz sprawdzenie czy ogniskom 53BP1 towarzyszą również skupienia białka PML i innych czynników naprawczych.

W rozdziale szóstym Autorka przedstawia szczegółowy opis materiałów użytych w badaniach. Zdaniem recenzenta takie szczegółowe informacje o materiałach są kluczowe dla reprodukowalności eksperymentów w badaniach naukowych. Na przykład w doświadczeniach CRISPR-Cas9 użyto plazmidów kodujących endonukleazę Cas9 i jej modyfikacje, jak również sgRNA z

sekwencją adresującą do subtelerowego regionu q29 chromosomu 3. Następnie opisane zostały metody biologii molekularnej użyte w przeprowadzonych doświadczeniach, umożliwiające śledzenie interakcji między składnikami systemu CRISPR-Cas9 i białkiem 53BP1, a także dynamiki i odpowiedzi komórek na uszkodzenia DNA.

Rozdział siódmy poświęcony jest otrzymanym wynikom badań, które skupiały się na analizie przestrzennej organizacji ognisk białka 53BP1 powstających w odpowiedzi na dwuniciowe pęknięcia DNA. Autorka badała te ogniska w kontekście uszkodzeń chromatyny indukowanych przez skupioną wiązkę światła widzialnego i endonukleazę Cas9 systemu CRISPR. Przeprowadziła również optymalizację minimalnej dawki światła, która efektywnie wprowadza uszkodzenie chromatyny, oraz zbadała lokalizację ognisk 53BP1 w kontekście miejsc docelowych dla systemu CRISPR-Cas9. Wyniki wykazały, że różne czynniki naprawcze DNA, takie jak BRCA1 i PML, również znajdują się w bliskim sąsiedztwie ognisk dCas9. Przeprowadzono analizę architektury ognisk 53BP1, która uwidoczniła różnice w rozmiarach ognisk w odpowiedzi na różne typy uszkodzeń DNA. Badania pokazały również, że długotrwała obecność aktywnej endonukleazy Cas9 może prowadzić do całkowitego odcięcia fragmentu chromosomu, mimo obecności ogniska naprawczego. Badania ujawniły na przykład, że długotrwała obecność aktywnej endonukleazy Cas9 może prowadzić do całkowitego odcięcia fragmentu chromosomu, mimo obecności ogniska naprawczego. Komórki z aktywnym systemem CRISPR-Cas9 mogły również ulegać nieprawidłowym podziałom, co podkreśla skomplikowaną dynamikę interakcji między mechanizmami naprawy DNA a narzędziami genetycznymi, takimi jak CRISPR. Uważam to za bardzo interesujący wniosek z przeprowadzonych badań.

Rozdział ósmy i ostatni zawiera dyskusję koncentrującą się na roli i reprezentacji ognisk 53BP1 jako rzeczywistych miejsc uszkodzeń DNA. Analiza obejmowała wykrywanie indywidualnych dwuniciowych pęknięć DNA poprzez obserwację ognisk 53BP1, zarówno po naświetleniu chromatyny światłem widzialnym, jak i po indukcji klastra uszkodzeń metodą CRISPR-Cas9. Badano również związek między ogniskami aktywnej endonukleazy Cas9 a brakiem współwystępowania sygnału markerów naprawy. W pracy omówiono architekturę ogniska naprawczego i jego lokalizację względem uszkodzenia. Wprowadzono porównanie pomiędzy efektami obserwowanymi przy zastosowaniu światła widzialnego i systemu CRISPR-Cas9. Zwrócono szczególną uwagę na znaczenie białka 53BP1 w procesie naprawy uszkodzeń DNA

indukowanych za pomocą metody CRISPR-Cas9, podkreślając jego kluczową rolę w odpowiedzi komórkowej na uszkodzenia DNA.

Pod koniec dyskusji zasygnalizowano nowe kierunki badań, które mają na celu identyfikację i analizę ścieżek naprawczych aktywowanych w odpowiedzi na dwuniciowe pęknięcia DNA. Celem tych badań jest lepsze zrozumienie mechanizmów naprawy DNA i ich potencjalne zastosowania w kontekście terapeutycznym i biotechnologicznym. Ważnym aspektem badań to zależność między cyklem komórkowym a uruchamianą ścieżką naprawczą. W pracy używano klasycznego, nieindukowalnego systemu CRISPR. Autorka zauważa, że najczęściej uruchamiana ścieżka to naprawa poprzez łączenie niehomologicznych końców.

Uwzględniono również możliwość, że nie wszystkie ogniska Cas9 sąsiadują z markerami dwóch głównych ścieżek naprawczych, sugerując, że może to oznaczać rozległe uszkodzenie DNA i uruchomienie jednej z alternatywnych ścieżek. Niezbędne są dalsze badania do eksploracji i potwierdzenia tego zjawiska. Podsumowując, dyskusja przeprowadzona przez Doktorantkę podkreśla potrzebę kontynuacji badań nad mechanizmami naprawy DNA, zwracając szczególną uwagę na zrozumienie roli i działania systemu CRISPR-Cas9 oraz związku między cyklem komórkowym a uruchamianymi ścieżkami naprawczymi.

Podsumowując, praca doktorska oferuje wgląd w skomplikowane i wieloczynnikowe (złożone) mechanizmy molekularne, które komórki wykorzystują do identyfikacji i naprawy uszkodzeń DNA. Zrozumienie roli i funkcji białek naprawczych oraz potencjalnych implikacji związanych z użyciem technologii CRISPR-Cas9 będzie miało, a nawet już ma, istotne znaczenie nie tylko w badaniach, ale również terapiach genetycznych. Dane i analizy zawarte w pracy mogą się przydać w przyszłych badaniach nad rozwojem takich terapii i oraz optymalizacji strategii leczenia chorób związanych z uszkodzeniem DNA.

Pytania i uwagi do doktorantki:

- Dokładność Metodologii:* Jak dokładna i powtarzalna jest metoda indukcji dwuniciowych pęknięć DNA za pomocą CRISPR-Cas9 i światła widzialnego? Jak zaplanowano replikaty techniczne i biologiczne doświadczeń? Jak oszacować błędy czy zmienność wyników w zależności od warunków eksperymentalnych?

- *Optymalizacja Dawek Światła:* Czy proces optymalizacji dawek światła był wystarczająco szeroki, aby uwzględnić różne typy komórek i ich różne reakcje na światło widzialne, czy też zaobserwowano małą zmienność? W szczególności dlaczego światło zielone wymaga znacznie wyższej dawki energii do indukcji dwuniciowych pęknięć DNA w porównaniu do światła niebieskiego? Nie do końca jest dla mnie zrozumiałe stwierdzenie, że wykazano iż indukcja uszkodzenia nie zależy od strumienia fotonów, lecz od całkowitej dawki energii dostarczonej do wybranego miejsca w jądrze komórkowym. Jakie są implikacje tych obserwacji?
- *Rola 53BP1:* Jakie są mechanizmy, przez które 53BP1 uczestniczy w naprawie DNA? Czy jest jedynym białkiem, które odgrywa tę rolę, czy może działać w połączeniu z innymi białkami, a jeśli tak to jakimi i w jakiej możliwej konfiguracji przestrzennej? Jak długo ogniska 53BP1 pozostają aktywne w odpowiedzi na uszkodzenia DNA? Jakie są długoterminowe efekty ich aktywacji na komórkę?
- *Kolokalizacja Sygnałów:* Jaką rolę odgrywa kolokalizacja sygnałów 53BP1 i Cas9 w mechanizmach naprawy DNA? Jak można oszacować czas trwania takiej kolokalizacji, oraz potwierdzić na poziomie molekularnym fizyczne interakcje między białkami?
- *Analiza Algorytmiczna:* Czy algorytm obliczeniowy użyty do analizy odległości między maksimami intensywności fluorescencji jest uniwersalny i może być stosowany do innych badań w tej dziedzinie? Jak uniknąć żmudnego ręcznego zliczania i mierzenia ognisk 53BP1?
- *Statystyczna Analiza Danych:* Jak analizowano i interpretowano zgromadzone dane numeryczne? Jakie metody statystyczne zastosowano do analizy danych i jak zapewniono kontrolę jakości wyników?
- *Interpretacja Mechanizmów Naprawy:* Czy mechanizmy naprawy DNA zostały wyczerpująco opisane? Czy można coś powiedzieć o alternatywnych ścieżkach naprawczych na podstawie wyników projektu?
- *Metody genomiczne w oparciu o sekwencjonowanie następnej generacji:* Czy wybrane metody badawcze, takie jak CRISPR-Cas9 i mikroskopia świetlna, są wystarczające do opisu mechanizmów naprawy DNA? Czy planowane są prace określające bardziej precyzyjnie lokalizację genomiczną uszkodzeń, ich specyficzność sekwencyjną (np. dzięki metodom uczenia maszynowego), ewentualnie czy użycie mikroskopii super-rozdzielczej przyniosłoby korzyści w zrozumieniu problemu?
- *Kolejne Badania:* Czy badanie będzie rozszerzane, aby uwzględnić inne białka i mechanizmy naprawy DNA, które mogą działać równolegle lub w synergii z 53BP1 w kontekście uszkodzeń DNA?

- *Znaczenie dla Terapii:* Jak odkrycia zawarte w rozprawie doktorskiej mogą wpływać na rozwój nowych terapii przeciwnowotworowych i leczenia chorób genetycznych? Czy istnieją już badania kliniczne potwierdzające ważność pęknięć w procesie medycznym? Jakie są potencjalne ograniczenia i wyzwania związane z wykorzystaniem tych odkryć w praktycznych zastosowaniach klinicznych?

Ocena końcowa

Rozprawa przedstawiona przez Doktorantkę jest napisana jest interesująco. Kandydatka pokazała, że dobrze rozumie i umiejętnie używa różne metody biologii molekularnej, potrafi formułować hipotezy badawcze i je następnie weryfikować eksperymentalnie.

Rozprawa doktorska świadczy o dobrym zrozumieniu przez Kandydatkę stawianych zadań badawczych. Cele rozprawy udało się zrealizować. Doktorantka wykazała, że zna i umiejętnie używa odpowiednio dobrane metody doświadczalne, formułuje hipotezy badawcze i je weryfikuje, tak więc ogólną wiedzę Doktorantki w dziedzinie nauk biologicznych w tematyce projektu należy ocenić pozytywnie.

Oceniam, że rozprawa ta spełnia zwyczajowe i ustawowe wymogi, stawiane rozprawom doktorskim, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, unaocznia ogólną wiedzę doświadczalną kandydata w zakresie biologii molekularnej oraz pokazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Naukowej Nauk Biologicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani magister Julity Wesołowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dariusz Plewczynski, PhD, Professor of Exact and Natural Sciences
Principal Investigator and Head
Phone: +48 22 554 36 54 or +48 22 234 7219, mobile: +48 504 726 203
e-mail: d.plewczynski@cent.uw.edu.pl or Dariusz.Plewczynski@pw.edu.pl www: <https://plewczynski-lab.org>

Laboratory of Functional and Structural Genomics LFSG
Centre of New Technologies, University of Warsaw
Banacha 2c Street, 02-097 Warsaw, Poland

Laboratory of Bioinformatics and Computational Genomics LB!GO
Faculty of Mathematics and Information Science, Warsaw University of Technology
ul. Koszykowa 75, 00-662 Warsaw, Poland