

Toruń, dnia 09.03.2017 r.

dr hab. Dariusz Jan Smoliński prof. UMK  
Zakład Biologii Komórki  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika  
w Toruniu

## RECENZJA

**rozprawy doktorskiej Pani magister Agnieszki Pierzyńskiej-Mach  
pt. „Obrazowanie subjądrowej lokalizacji, tempa i skuteczności nieplanowanej syntezy  
DNA indukowanej UVC, z wykorzystaniem metod mikroskopii fluorescencyjnej,  
konfokalnej i super-rozdzielczej”**

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 z dnia 21.06.2016 r.

Uszkodzenia jądrowego DNA pod wpływem promieniowania ultrafioletowego (UV) stanowią jedną z głównych przyczyn mutacji komórek skóry, oraz mogą prowadzić do kancerogenezy. W związku ze zmniejszaniem się warstwy ozonowej wpływ UV na skórę stał się w ostatnich latach przedmiotem intensywnych badań. Jedną z podstawowych dróg naprawy uszkodzonego pod wpływem UV DNA jest szlak naprawy poprzez wycięcie nukleotydów (Nucleotide Excision Repair, NER). Jest to jeden z najbardziej powszechnych szlaków naprawy DNA w komórkach eukariotycznych pozwalający na wszechstronne naprawy zmian strukturalnych w DNA. W ten proces naprawy zaangażowane są białka charakterystyczne tylko dla niego, ale również białka związane z replikacją czy procesem transkrypcji. Ostatnim etapem naprawy DNA ścieżką NER jest dobudowanie nukleotydów w rejonie uszkodzonego fragmentu, w procesie tzw. nieplanowanej syntezy DNA (Unscheduled DNA Synthesis, UDS). Podstawowym celem niniejszej pracy była optymalizacja metody wizualizacji subjądrowej lokalizacji miejsc UDS. Ponadto Autorka postanowiła zbadać wpływ wielkości

dawki UV na efektywność tego procesu, oraz poznać zmiany jego efektywności w czasie po ekspozycji komórek na promieniowanie UV.

Układ pracy jest zgodny z zasadami redagowania rozpraw doktorskich. Treść odpowiada tematowi określoneemu w tytule. Rozprawa została podzielona na standardowe w pracach biologicznych rozdziały. W streszczeniu napisanym precyzyjnym językiem możemy prześledzić kolejne kroki, zadawane pytania i uzyskiwane na nie odpowiedzi, które prowadziły do zrozumienia procesów związanych z precyzyjną wizualizacją subjądrowej lokalizacji fragmentów DNA syntetyzowanych w procesie UDS. Wstęp liczący 25 stron opisuje wpływ promieniowania ultrafioletowego na strukturę DNA, powstanie przejściowych fotoproduktów, procesy naprawy DNA. Autorka definiuje proces NER, szczegółowo opisując szlaki naprawy DNA i białka uczestniczące w tym procesie. W dalszej części wstępu opisane zostały genetyczne schorzenia związane z upośledzeniem szlaku naprawy DNA przez wycięcie nukleotydu. Po tym dobrze zarysowanym wstępie teoretycznym ostatnia część tego rozdziału to kompendium na temat metod detekcji poszczególnych etapów naprawy NER takich jak opis warunków eksperymentów podczas naświetlania komórek promienowaniem UVC, sposoby detekcji powstałych fotoproduktów, detekcja białek uczestniczących w tym procesie. W dalszej części tego rozdziału autorka wyczerpująco opisała stan wiedzy i używane dotychczas metody detekcji uzupełnionych fragmentów DNA w procesie UDS, co stanowi dobre wprowadzenie do badań przez Nią prowadzonych. Kolejny rozdział to dobrze zdefiniowane szczegółowe cele pracy. Rozdział poświęcony materiałowi i metodom podzielony został na podrozdziały w których szczegółowo opisane zostały metody i techniki doświadczalne zastosowane w pracy. Szczególnie wyczerpująco została omówiona obróbka i analiza obrazu. Zarówno wstęp jak i materiał i metody ilustrowane są fotografiami, tabelami i rycinami dobrze ilustrującymi treści zawarte w tych rozdziałach. Najobszerniejszą część rozprawy stanowi opis wyników badań.

Aby zrealizować główny cel pracy do obrazowania rozkładu przestrzennego dobudowanych fragmentów nici DNA wykorzystano nowy analog tymidyny – etynylodeoksyurydynę (EdU). Główną zaletą użycia reakcji „click” w celu detekcji wbudowanej EdU do DNA jest brak etapu denaturacji DNA, którą stosuje się w klasycznej metodzie - immunofluorescencyjnej detekcji wbudowanych w DNA analogów tymidyny takich jak BrdU.

Wstępna analiza obrazów komórek eksponowanych na UV z użyciem inkubacji z EdU i techniki click pozwoliła na zidentyfikowanie charakterystycznego wzoru miejsc UDS. Wzór ten można opisać jako dość jednolity, o marmurkowym charakterze, z miejscami o wyższej i niższej intensywności fluorescencji, jednak bez wyodrębnionych w jakikolwiek sposób

ognisk czy skupisk miejsc UDS. Obserwacja ta nie jest zgodna z obserwacjami wzoru przestrzennego miejsc UDS znakowanych BrdU. Przeprowadzona równolegle analiza miejsc UDS z wykorzystaniem BrdU i denaturacji DNA wykazały istnienie od kilku do kilkudziesięciu ognisk w detekcji immunofluorescencyjnej BrdU. Ogniska te odseparowane są w przestrzeni jądra komórkowego i występują w dużych odległościach od siebie. Taki wzór otrzymany metodą immunofluorescencyjną obserwowano niezależnie od dawki UV. Wyniki te sugerowały, że nieplanowana synteza DNA zachodzi w wybranych obszarach chromatyny co jest sprzeczne z wynikami uzyskanymi w metodzie click. Na pochwałę zasługuje rzetelne wyjaśnienie tych różnic i to zarówno na bazie zastosowanej techniki immunofluorescencyjnej wymagającej do detekcji miejsc UDS denaturacji DNA jak i przez zastosowanie bardzo zaawansowanych wysokoczułych lub wysokorozdzielczych technik mikroskopowych.

Do najważniejszych wyników pracy należy zaliczyć:

- wykazanie, że użycie etynylodeoksyurydyny pokazuje subjądrowy wzór przestrzenny miejsc naprawy DNA w sposób bardziej precyzyjny niż detekcja BrdU.
- udowodnienie, że niekompletna denaturacja DNA oraz degradacja DNA podczas procesu denaturacji, obniża efektywność detekcji cząsteczek BrdU przez przeciwciała i w ten sposób zaburza końcowy wzór miejsc naprawy DNA.
- stwierdzenie, na podstawie dobrze zaplanowanych kompleksowych badań metodami obrazowania mikroskopowego, od mikroskopii fluorescencyjnej szerokiego pola do super-rozdzielczych metod mikroskopowych, że rozkład miejsc UDS w jądrze jest jednolity - składa się z ogromnej liczby ognisk o małych rozmiarach, a obserwacja formowania dużych skupisk UDS uzyskana w metodzie immunofluorescencyjnej, wynika z artefaktu w tej metodzie.
- obserwacja, że miejsca UDS położone są prawdopodobnie w euchromatynie
- ustalenie, że ilość EdU wbudowanej w procesie nieplanowanej syntezy DNA zależna jest od dawki promieniowania UV dla niskiego przedziału dawki, natomiast ekspozycja komórek na bardzo wysokie dawki UV skutkuje spadkiem efektywności UDS co związane jest prawdopodobnie z niewystarczającą dostępnością czynników naprawczych względem liczby powstających uszkodzeń. Można przypuszczać, że przy ekspozycji na maksymalną dawkę UV aktywowana zostaje apoptoza, a nie naprawa DNA
- i na koniec zaprezentowana w pracy precyzyjna analiza czasu trwania naprawy DNA

Ostatni rozdział rozprawy to głównie dyskusja wyników dotyczących wizualizacji miejsc nieplanowanej syntezy DNA w odniesieniu do aktualnej literatury. W takim ujęciu wyniki są dobrze omówione i skonfrontowane z aktualnym stanem wiedzy. Tym łatwiej czyta się dyskusję, że już w rozdziale opisującym wyniki Autorka wstępnie dyskutowała swoje wyniki z literaturą. W dyskusji zabrakło mi jednak odniesienia się Autorki do wyboru modelu badań – ludzkich fibroblastów. Brak też analizy porównawczej wyników NER jak i samej syntezy UDS indukowanej promieniowaniem UV na różnych modelach komórek ludzkich, ssaków czy innych organizmów eukariotycznych. Brakuje mi też analizy detekcji NER pod wpływem promieniowania ultrafioletowego w odniesieniu do innych czynników np. chemicznych.

Rozdział wnioski dobrze podsumowuje rezultaty badań uzyskane w niniejszej pracy. Literatura obejmująca 168 pozycji jest aktualna, dobrze dobrana i prawidłowo zacytowana. Generalnie praca napisana jest analitycznym precyzyjnym językiem, czyta się ją bardzo dobrze. W tekście dysertacji Autorka nie ustrzegła się przed drobnymi błędami (kilka literówek) czy „skrótami myślowymi”, które czytając w sposób dosłowny nie zawsze precyzyjnie oddaje myśl Autorki.

Uwagi:

Badania przedstawione w tej rozprawie wpisują się w najlepszy nurt badań biologii komórki i biofizyki. Należy podziwiać rzetelność tych badań i logikę prowadzonych kolejnych eksperymentów. Doceniając wyniki badań uzyskane przez Autorkę mam jeszcze kilka uwag. Bardzo ciekawe są wyniki dotyczące pomiaru UDS w komórkach podlegających replikacji podczas fazy S. Zadanie było bardzo trudne ze względu na konieczność odróżnienia miejsc wbudowanych nukleotydów podczas procesu replikacji od miejsc inkorporacji analogów tymidyny w procesie nieplanowanej syntezy DNA. Aby osiągnąć zamierzony cel Autorka wielokrotnie zmieniała procedurę podwójnych pulsów inkorporacji EdU i BrdU i detekcji tych sygnałów. W stosunku do poprzednich eksperymentów niezbędna była: zmiana sposobu utrwalania materiału, czy sposób denaturacji DNA dla metody immunofluorescencyjnej itp. Ważnym wynikiem tych eksperymentów jest obserwacja, że w wyniku ekspozycji na promieniowanie UV następuje prawdopodobnie spowolnienie i częściowe zahamowanie procesu replikacji co związane jest prawdopodobnie z zaangażowaniem niektórych białek niezbędnych podczas replikacji, jednocześnie w procesie w indukowanej naprawy DNA. Pomimo tych trudności Autorce udało się na uzyskanie ciekawych wyników w tych trudnych warunkach detekcji podczas fazy S. Tym bardziej ciekawi mnie czy Autorka próbowała określić poziom i przestrzenną lokalizację miejsc nieplanowanej syntezy DNA oddzielnie w

fazie G0 G1 czy w fazie G2, a nie łącznie dla jak to prezentowane jest w wynikach. Co wydaje się łatwiejsze niż detekcja UDS podczas replikacji. Ciekawi mnie to tym bardziej, że zaobserwowano duży rozrzut poziomu ilości wbudowanych cząsteczek EdU, co sugeruje zróżnicowany poziom wydajności procesu nieplanowanej syntezy DNA w poszczególnych komórkach w preparacie poddanym uszkodzeniu UVC o zadanej dawce. Może to być związane z różną aktywnością metaboliczną tych komórek w różnych etapach interfazy, czy choćby różną ilością DNA w przebiegu interfazy. Podczas obrony chciałbym zapytać czy przy okazji prowadzonych eksperymentów podjęto próby analizy rozkładu przestrzennego wbudowanych cząsteczek EdU również podczas mitozy. Byłoby interesujące dla mnie usłyszeć również opinię Autorki dysertacji na temat wyboru sposobu utrwalenia materiału zastosowanego w procedurze, co miało zapewne wpływ na organizację przestrzenną terytoriów chromosomowych w badanym materiale.

W podsumowaniu, na podstawie dokonanej wysoce pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej, stwierdzam, że recenzowana praca spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim i wnioskuje do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Pierzyńskiej-Mach do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wysoką wartość poznawczą wnoszoną do istniejącej wiedzy ważne fakty o dynamice przebiegu naprawy DNA indukowanej promieniowaniem UV, pozwalam sobie złożyć wniosek do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii o wyróżnienie tej rozprawy stosowną nagrodą.

*Dariusz Jan Smoliński*  
dr hab. Dariusz Jan Smoliński, prof. UMK