

Streszczenie rozprawy doktorskiej

mgr Agnieszki Pierzyńskiej-Mach

pt.: „Obrazowanie subjądrowej lokalizacji, tempa i skuteczności nieplanowanej syntezy DNA indukowanej UVC, z wykorzystaniem metod mikroskopii fluorescencyjnej, konfokalnej i super-rozdzielczej”

Jedną z podstawowych dróg naprawy DNA w komórkach eukariotycznych jest szlak naprawy poprzez wycięcie nukleotydów (Nucleotide Excision Repair, NER), który jest aktywowany w odpowiedzi na uszkodzenia powodujące geometryczną deformację DNA (indukowane promieniowaniem UV lub czynnikami chemicznymi). Ostatnim etapem naprawy NER jest dobudowanie nukleotydów w rejonie uszkodzonego fragmentu, w procesie tzw. nieplanowanej syntezy DNA (Unscheduled DNA Synthesis, UDS). Precyzyjna wizualizacja subjądrowej lokalizacji miejsc UDS w komórkach fibroblastów ludzkich może dostarczyć nowych informacji na temat funkcjonowania i efektywności tego szlaku naprawy. Dotychczasowe badania nad UDS *in situ* wykorzystywały wbudowywanie do naprawianego DNA dwóch typów cząsteczek: tymidyny znakowanej trytem ($^3\text{H-TdR}$) lub bromodeoksyurydyny (BrdU). Obrazy mikroskopowe wyraźnie wskazywały na istnienie pojedynczych, dużych ognisk wbudowanej BrdU, lub pojedyncze miejsca wbudowanej $^3\text{H-TdR}$, sugerując aktywną naprawę w wybranych rejonach chromatyny. Jednak ze względu na ograniczenia stosowanych metod szczegółowy rozkład przestrzenny miejsc UDS, jak i mechanizm tego procesu, pozostawały trudne do określenia.

Podstawowym celem niniejszej pracy była wizualizacja subjądrowej lokalizacji miejsc UDS, reprezentujących ostatni etap naprawy NER. Do tego celu wykorzystano nowy analog tymidyny – etynylodeoksyurydynę (EdU). Metoda detekcji wbudowanej EdU poprzez reakcję „click” z azydkiem barwnika fluorescencyjnego posiada wiele zalet, takich jak mały rozmiar cząsteczki barwnika (azydek) pozwalający na efektywną penetrację w struktury chromatyny, brak etapu denaturacji DNA, co ułatwia zachowanie niezaburzonej struktury jądra, oraz znikome tło w zarejestrowanych obrazach mikroskopowych. Wyżej wymienione cechy pozwoliły na zminimalizowanie artefaktów wynikających z niedoskonałości metod stosowanych poprzednio do obrazowania miejsc UDS.

Do analizy lokalizacji miejsc UDS w chromatynie wykorzystano obrazy uzyskane kilkoma metodami mikroskopowymi - mikroskopią konfokalną i fluorescencyjną mikroskopią szerokiego pola, przy użyciu różnych detektorów (fotopowielacza, fotodiody lawinowej i wysokoczułej kamery EMCCD). Uzyskane w ten sposób obrazy pokazują dość równomierny rozkład przestrzenny miejsc UDS w obrębie chromatyny (po ekspozycji komórek na dawkę UVC 30–3000 J/m²). Nie zaobserwowano formowania dużych skupisk wbudowanej EdU. UDS obrazowano również z wykorzystaniem super-rozdzielczych technik mikroskopowych, takich jak Single Molecule Localisation Microscopy (SMLM) oraz direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (dSTORM). Użycie tych metod pozwoliło na zarejestrowanie rozkładu przestrzennego rejonów UDS, złożonego z ogromnej liczby ognisk o małych rozmiarach, niemożliwego do zarejestrowania przy użyciu konwencjonalnej mikroskopii fluorescencyjnej lub konfokalnej, ze względu na

ograniczoną rozdzielczość optyczną. Obserwacja ta ma znaczące konsekwencje dla poznania obecności, struktury i roli ognisk naprawczych indukowanych promieniowaniem UVC. W pracy przeprowadzono wizualizację miejsc UDS techniką 3D dSTORM, co pozwoliło na zobrazowanie nieomal równomiernie rozproszonych niewielkich ognisk UDS. Zastosowanie barwienia DNA jądrowego sondą fluorescencyjną YOYO-1 w mikroskopii dSTORM umożliwiło obserwację położenia naprawionych fragmentów DNA względem chromatyny o różnym stopniu skondensowania, i pozwoliło stwierdzić, że w wielu przypadkach proces ten odbywał się w euchromatynie.

W celu zrozumienia różnic między typowym rozkładem przestrzennym miejsc UDS znakowanych EdU lub BrdU, przeprowadzono analizę wpływu denaturacji DNA kwasem solnym (4M), niezbędnej w procedurze reakcji immunofluorescencji przeciwko cząsteczkom BrdU, na strukturę DNA i jądra komórkowego. Wykorzystując różnicowe barwienie jedno- i dwuniciowych odcinków DNA przez oranż akrydyny (AO) pokazano, że denaturacja DNA w procesie detekcji BrdU jest niepełna, oraz że przy dłuższym traktowaniu DNA kwasem polimer ulega stopniowej degradacji. Wyjaśnia to, przynajmniej w części, artefakty związane z obrazowaniem miejsc UDS wyznakowanych przez BrdU.

Opracowano również optymalną procedurę znakowania fluorescencyjnego miejsc UDS stosując kolejno puls EdU i BrdU w tej samej komórce w celu badania kolejnych etapów naprawy DNA lub potencjalnego rozróżnienia procesu replikacji od procesu naprawy NER. Zastosowano denaturację cieplną oraz roztwór formamidu, co pozwoliło na późniejszą obserwację zarówno miejsc wbudowania prekursora EdU, jak i BrdU, ograniczając wystąpienie artefaktów na obrazie mikroskopowym. Dzięki wprowadzonym zmianom wykazano, że potencjalnie jest możliwe zobrazowanie postępu procesu dobudowywania fragmentów DNA w czasie, oraz wskazano na ograniczenia tego rodzaju metody przy obrazowaniu słabych sygnałów fluorescencji reprezentujących miejsca UDS.

Następnie przeprowadzono analizę wpływu dawki promieniowania UVC na efektywność naprawy DNA. W populacji komórek zaobserwowano różne poziomy ilości wbudowania EdU w poszczególnych komórkach wyróżniając trzy przedziały – brak wbudowania EdU, normalny poziom wbudowanego EdU, oraz bardzo wysoki poziom. 90% komórek ekspozycyjnych na dawkę 5 J/m^2 wykazało normalny poziom UDS. Użycie wyższych dawek z zakresu $30\text{--}3000 \text{ J/m}^2$ nie zwiększało poziomu wbudowywania EdU, a zatem wydajności naprawy DNA. Przeciwnie, w tych przypadkach zwiększona była subpopulacja komórek nie wykazujących UDS, co sugeruje, że uszkodzenia zadane dużą dawką UVC skutkują niższą szansą poprawnego ukończenia kolejnych kroków naprawy. Przeprowadzono również analizę czasu trwania naprawy DNA w kontekście naprawy wszystkich uszkodzonych miejsc w chromatynie. Wykazano, że naprawa DNA zaszła już po 15 minutach od ekspozycji na UVC, lecz najbardziej znaczący wzrost ilości wbudowanego prekursora następował w przedziale czasu 1–4 godzin od uszkodzenia DNA.

Reasumując, w ramach badań opisanych w niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono wizualizację miejsc naprawy DNA poprzez wycięcie nukleotydów obrazując ostatni jej etap – nieplanowaną syntezę DNA, którą wywołano poprzez uszkodzenie DNA promieniowaniem UVC. Do detekcji nieplanowanej syntezy DNA użyto dwóch analogów tymidyny – bromodeoksyurydyny i etynylodeoksyurydyny, oraz wykazano po raz pierwszy, iż użycie etynylodeoksyurydyny pokazuje

subjądrowy rozkład przestrzenny miejsc UDS w sposób bardziej precyzyjny niż BrdU. Zoptymalizowano procedurę znakowania miejsc UDS każdym z analogów, jak i procedurę podwójnego znakowania z wykorzystaniem EdU oraz BrdU w jednej próbce. Poprzez użycie serii metod obrazowania mikroskopowego, od mikroskopii fluorescencyjnej szerokiego pola do super-rozdzielczych metod mikroskopowych, udowodniono, iż duża subpopulacja komórek nie jest w stanie dokończyć naprawy DNA, a rozmiary tej subpopulacji zależą od dostarczonej dawki UVC.

Publikacja, na podstawie której przygotowana została rozprawa doktorska:

Pierzyńska-Mach A, Szczurek A, Cella Zancacchi F, Pennacchietti F, Drukała J, Diaspro A, Cremer C, Darzynkiewicz Z, Dobrucki JW; *Subnuclear localization, rates and effectiveness of UVC-induced unscheduled DNA synthesis visualized by fluorescence widefield, confocal and super-resolution microscopy*; Cell Cycle; 2016;15(8):1156-67; doi: 10.1080/15384101.2016.1158377;

17 MAR. 2017

