



Prof. dr hab. Marta Miączyńska  
Pracownia Biologii Komórki  
Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej  
w Warszawie

Warszawa, 03.11.2016 r.

## Recenzja

rozprawy doktorskiej pani mgr Pauliny Rybak

### **p.t.: „Sygnalizacja i naprawa DNA w warunkach stresu replikacyjnego”**

wykonanej pod kierunkiem pana prof. dr. hab. Jerzego Dobruckiego  
w Zakładzie Biofizyki Komórki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii  
Uniwersytetu Jagiellońskiego

W swej rozprawie doktorskiej pani mgr Paulina Rybak podjęła się badań z zakresu biologii komórki, a przedmiotem jej zainteresowań stały się procesy wywoływania i przewycięzania stresu replikacyjnego spowodowanego uszkodzeniami DNA. Tematyka pracy pani Rybak dotyczy więc powiązań pomiędzy dwoma fundamentalnymi procesami komórkowymi, jakimi są replikacja DNA i jego naprawa. W szczególności, Doktorantka skupiła się na badaniu koordynacji i organizacji przestrzennej obu procesów w jądrze komórkowym. W tym celu opracowała odpowiednie metody znakowania komórek markerami fluorescencyjnymi oraz zastosowała zaawansowane metody wysokorozdzielczej mikroskopii konfokalnej połączone z ilościową analizą obrazów. Do wywoływania uszkodzeń DNA wybrała inhibitory topoizomeraz, wśród których są związki używane w praktyce klinicznej w terapii nowotworów. Waga podjętego tematu jest więc istotna z kilku względów. Po pierwsze, badania zaprezentowane w rozprawie poszerzają naszą wiedzę podstawową o procesach życiowych zachodzących na poziomie komórkowym. Po drugie, dotyczą organizacji przestrzennej tych procesów, co pozostaje aspektem słabo poznanym i wymagającym dalszych studiów. Po trzecie, badania Doktorantki dostarczają nowych informacji o mechanizmach działania substancji terapeutycznych, co – w dłuższej perspektywie – może stanowić podstawę do ich dalszego udoskonalania.

### **Formalny opis rozprawy**

Zasadniczą część rozprawy stanowi spójny tematycznie zbiór czterech publikacji Doktorantki. W dwóch z nich pani mgr Rybak jest pierwszą autorką, w kolejnej – autorką drugą, a w ostatniej jest na pozycji trzeciej. Wszystkie prace zostały opublikowane w renomowanych, recenzowanych periodykach zagranicznych, posiadających impact factor. Są to, w kolejności zamieszczenia w rozprawie, następujące publikacje:

**MIĘDZYNARODOWY INSTYTUT BIOLOGII MOLEKULARNEJ I KOMÓRKOWEJ W WARSZAWIE**

ul. Ks. Trojdena 4, 02-109 Warszawa  
secretariat@iimcb.gov.pl

tel.: (48 22) 597 07 00, fax: (48 22) 597 07 15  
www.iimcb.gov.pl



1. Zhao H, Dobrucki J, **Rybak P**, Traganos F, Dorota Halicka H, Darzynkiewicz Z. (2011) Induction of DNA damage signaling by oxidative stress in relation to DNA replication as detected using "click chemistry". *Cytometry Part A*. 79: 897-902.
2. Zhao H, **Rybak P**, Dobrucki J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. (2012) Relationship of DNA damage signaling to DNA replication following treatment with DNA topoisomerase inhibitors camptothecin/topotecan, mitoxantrone, or etoposide. *Cytometry Part A*. 81: 45-51.
3. **Rybak P**, Hoang A, Bujnowicz L, Bernas T, Berniak K, Zarebski MA, Darzynkiewicz Z, Dobrucki J. (2016) Low level phosphorylation of histone H2AX on serine 139 ( $\gamma$ H2AX) is not associated with DNA double-strand breaks. *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.10411.
4. **Rybak P**, Waligórska A, Bujnowicz Ł, Hoang A, Dobrucki JW. (2015) Activation of new replication foci under conditions of replication stress. *Cell Cycle*. 14: 2634-47.

Całość rozprawy liczy 112 stron maszynopisu. Rozprawa rozpoczyna się wykazem stosowanych skrótów oraz streszczeniami w językach polskim i angielskim. Jej kolejną częścią jest tło badań, które składa się z pięciu rozdziałów i liczy 18 stron, a po nim następuje jednostronicowe przedstawienie celu pracy. W ramach opisu wykonanych badań zamieszczono cztery wyżej wymienione publikacje, poprzedzone krótkimi wprowadzeniami. Kolejnym rozdziałem są perspektywy badawcze, omówione w trzech podrozdziałach i liczące 11 stron. Ta część zawiera także dane doświadczalne, które nie znalazły się w publikacjach. Rozprawę kończy jednostronicowe podsumowanie oraz bibliografia, licząca ponad 160 pozycji.

### Ocena merytoryczna

**Tło badań** jest pierwszą częścią rozprawy i składa się z pięciu rozdziałów przedstawiających kolejno zagadnienia dotyczące: (1) replikacji DNA, (2) mechanizmów uszkodzeń i naprawy DNA, (3) sygnalizacji i naprawy dwuniciowych pęknięć DNA, (4) znaczenia modyfikacji histonu H2AX ( $\gamma$ H2AX) jako markera dwuniciowych pęknięć DNA oraz (5) mechanizmów działania topoizomeraz. W tej części pracy zamieszczono 10 rysunków, które przedstawiają schematy lub obrazy mikroskopowe ilustrujące omawiane kwestie.

Rozdział „Tło badań” jest logicznie skonstruowany, ciekawie napisany i stanowi odpowiednie wprowadzenie do tematyki badań Doktorantki. Przedstawione treści dobrano w sposób prawidłowy, w oparciu o bogate piśmiennictwo. Zamieszczone ilustracje pomagają czytelnikowi w śledzeniu szczegółów skomplikowanych procesów komórkowych. Nie będąc specjalistą w dziedzinie replikacji i naprawy DNA, wiele się z tej części rozprawy nauczyłam, zwłaszcza w zakresie najnowszych odkryć na tym polu. Rozpoczynając czytanie rozprawy zastanawiałam się, czy w tej części nie powinno znaleźć się także omówienie koncepcji terytoriów chromosomowych jako systemu przestrzennej organizacji jądra komórkowego, ale odpowiednie informacje na ten temat znalazłam później w rozdziale „Perspektywy badawcze”. Generalnie, nie mam zastrzeżeń do wprowadzającej części rozprawy i wysoko ją oceniam.

Jako **cel pracy** Doktorantka postawiła sobie „opisanie procesów wywoływania i przezwyciężania stresu replikacyjnego”, wywoływanego przez inhibitory topoizomeraz, „w



kontekście przestrzennej organizacji chromatyny w jądrze komórkowym”. Ten prawidłowo sformułowany cel ogólny został osiągnięty w toku badań poprzez realizację czterech celów szczegółowych, zasadniczo odpowiadających zagadnieniom czterech zamieszczonych w rozprawie publikacji. Już definiując cel pracy, Doktorantka zaznaczyła, iż podstawową techniką doświadczalną w jej badaniach była wysokorozdzielcza mikroskopia konfokalna.

#### **PUBLIKACJE nr 1 i nr 2:**

1. Zhao H, Dobrucki J, **Rybak P**, Traganos F, Dorota Halicka H, Darzynkiewicz Z. (2011) Induction of DNA damage signaling by oxidative stress in relation to DNA replication as detected using "click chemistry". *Cytometry Part A*. 79: 897-902.
2. Zhao H, **Rybak P**, Dobrucki J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. (2012) Relationship of DNA damage signaling to DNA replication following treatment with DNA topoisomerase inhibitors camptothecin/topotecan, mitoxantrone, or etoposide. *Cytometry Part A*. 81: 45-51.

Publikacje te opisują wyniki badań wstępnych, które stanowiły podwaliny do dalszej pracy Doktorantki, zarówno pod względem metodycznym, jak i koncepcyjnym. Zgodnie z przedstawionymi oświadczeniami dotyczącymi wkładu poszczególnych współautorów, wkład pani mgr Pauliny Rybak do obu publikacji obejmował: opracowanie metod doświadczalnych i przeprowadzenie badań metodą mikroskopii konfokalnej oraz przygotowanie rycin do druku. Pozwala to wnioskować, iż w publikacji nr 1 Doktorantka wykonała doświadczenia obrazujące obszary replikacji DNA w stosunku do rozmieszczenia znacznika  $\gamma$ H2AX jako markera dwuniciowych pęknięć DNA w komórkach A549 poddanych stresowi oksydacyjnemu (Ryc. 4). Z kolei w publikacji nr 2 pani mgr Rybak przeprowadziła analogiczne eksperymenty w komórkach A549 traktowanych trzema inhibitorami topoisomeras: topotekaniem, mitoksantronem i etopozydem, tym razem włącznie z analizą ilościową kolokalizacji znaczników we wczesnej i późnej fazie S cyklu komórkowego (Ryc. 2 i Tabela 2). W obu przypadkach, wykonanie tych doświadczeń wymagało uprzedniego znakowania obszarów replikacji DNA poprzez podanie komórkom analogu tymidyny (EdU) i przeprowadzenie jego reakcji typu „click” z kompleksem fluorescencyjnym. Wizualizacja znacznika  $\gamma$ H2AX następowała w wyniku barwienia immunofluorescencyjnego z wykorzystaniem przeciwciał rozpoznających ufosforylowaną serynę 139 histonu H2AX. Metoda ta (i jej modyfikacje) stały się podstawą dalszych badań Doktorantki, opisanych w dwóch kolejnych, już pierwszoautorskich, publikacjach nr 3 i 4. Choć w omawianych publikacjach nr 1 i 2 metoda mikroskopii konfokalnej była zasadniczo uzupełniająca w stosunku do technik cytometrycznych, doświadczenia Doktorantki przyczyniły się do wyciągnięcia wniosków o różnej specyficzności inhibitorów topoisomeras w stosunku do obszarów replikacji i o różnej efektywności ich działania.

Z obowiązku recenzenta zauważę, że w legendzie do Ryc. 4 w publikacji nr 1 (Zhao i wsp., 2011) nie podano czym różnią się obrazy w panelach A, B i C (jedynie opis w tekście wskazuje na różne etapy fazy S cyklu komórkowego). Z kolei na Ryc. 2 publikacji nr 2 (Zhao i wsp., 2012) zastanawia brak obrazów komórek nietraktowanych inhibitorami, które powinny stanowić kontrolę do porównania.



### **PUBLIKACJA nr 3:**

3. **Rybak P**, Hoang A, Bujnowicz L, Bernas T, Berniak K, Zarebski MA, Darzynkiewicz Z, Dobrucki J. (2016) Low level phosphorylation of histone H2AX on serine 139 ( $\gamma$ H2AX) is not associated with DNA double-strand breaks. *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.10411.

Zgodnie z przedstawionym oświadczeniem, wkład pani mgr Pauliny Rybak do powyższej publikacji obejmował: samodzielne opracowanie metod doświadczalnych, przeprowadzenie doświadczeń i przygotowanie rycin do druku oraz, we współpracy z innymi autorami, opracowanie koncepcji i założeń, przeprowadzenie analizy ilościowej danych oraz przygotowanie manuskryptu. Jest to niewątpliwie wkład wiodący w powstanie publikacji.

W pracy tej przeprowadzono systematyczną, ilościową analizę występowania ognisk znacznika  $\gamma$ H2AX w komórkach traktowanych trzema inhibitorami topoizomeras, opartą na obrazowaniu komórek z użyciem wysokorozdzielczej mikroskopii konfokalnej. W komórkach równolegle analizowano także obszary replikacji (poprzez wizualizację EdU) oraz lokalizację białka 53BP1 jako znacznika miejsc naprawy dwuniciowych pęknięć DNA. Najważniejszym osiągnięciem przedstawionych badań był opis dwóch typów skupisk (ognisk)  $\gamma$ H2AX, określonych jako duże i jasne („bright foci”) oraz jako małe i nikłe („dim foci”), których występowanie zmieniało się w odpowiedzi na traktowanie komórek poszczególnymi inhibitorami. Co istotne, skupiska  $\gamma$ H2AX o nikłej intensywności były obecne także w komórkach nietraktowanych inhibitorami, a ich dynamika zmian w cyklu komórkowym oraz brak kolokalizacji z miejscami replikacji i z białkiem 53BP1 wskazują, że skupiska te nie znaczą miejsc uszkodzeń DNA (w przeciwieństwie do skupisk  $\gamma$ H2AX dużych i jasnych). Dane te dowodzą, że  $\gamma$ H2AX może występować w komórkach także w regionach nieuszkodzonej chromatyny, choć jego funkcja w tych miejscach pozostaje niejasna.

Generalnie, opisane wyniki stanowią spójną, logiczną całość i są przykładem solidnej pracy naukowej. Publikacja była recenzowana przez specjalistów przed przyjęciem do druku i trudno doszukiwać się w niej znaczących niedociągnięć. Wyrażę jednak opinię, że treść publikacji byłaby łatwiejsza do śledzenia przez czytelnika, gdyby tok przedstawiania wyników odpowiadał numeracji rycin. W zaprezentowanej publikacji wyniki w tekście są omawiane osobno i po kolei dla poszczególnych inhibitorów, podczas gdy ryciny przedstawiają wyniki określonego typu doświadczenia zbiorczo dla wszystkich inhibitorów. Taka logika prezentacji danych w tekście wymaga od czytelnika nieustannego przeskakiwania pomiędzy rycinami w przód i w tył, co utrudnia zrozumienie treści.

W kwestiach merytorycznych, zastanowił mnie wzór barwienia białka 53BP1, na większości zdjęć przedstawiony w słabo widocznym kolorze niebieskim. Czy wiadomo dlaczego w większości analizowanych warunków doświadczalnych, nawet po wywołaniu uszkodzeń DNA, liczba skupisk znakowanych przez 53BP1 jest znacznie niższa niż  $\gamma$ H2AX (m.in. na podstawie danych Ryc. S3). Czy jest to problem techniczny (np. wynikający z gorszych właściwości użytego przeciwciała), czy też odzwierciedla jakiś aspekt procesów biologicznych?

### **PUBLIKACJA nr 4:**

4. **Rybak P**, Waligórska A, Bujnowicz Ł, Hoang A, Dobrucki JW. (2015) Activation of new replication foci under conditions of replication stress. *Cell Cycle*. 14: 2634-47.



Zgodnie z przedstawionym oświadczeniem, wkład pani mgr Pauliny Rybak do powyższej publikacji obejmował: opracowanie większości metod doświadczalnych, przeprowadzenie większości doświadczeń i przygotowanie rycin do druku oraz, we współpracy z promotorem prof. dr. hab. J. Dobruckim, opracowanie koncepcji i założeń oraz przygotowanie manuskryptu. Podobnie jak w przypadku publikacji nr 3, wkład pani mgr Rybak jest tutaj wiodący. W kwestiach edytorskich muszę zauważyć, że w wydruku rozprawy nie zamieszczono drugiej strony tej publikacji (str. 2635 w numeracji czasopisma), którą przeczytałam w wersji online.

Celem zaprezentowanych doświadczeń było zbadanie globalnej odpowiedzi komórki na stres replikacyjny wywołany inhibitorem topoizomerazy typu I (topotekanem). W pracy tej rozszerzono zakres stosowanych technik doświadczalnych m.in. o analizy dwóch, rozdzielonych w czasie, pulsów znaczników replikacji oraz o obrazowanie przyżyciowe komórek. Podobnie jak w publikacji nr 3, uzyskane obrazy mikroskopowe poddano starannej analizie ilościowej mierząc parametry informujące o liczbie i rozmieszczeniu miejsc replikacji, co było kluczowym elementem badań.

W toku prac wykazano bowiem, że komórki poddane warunkom łagodnego stresu replikacyjnego poprzez działanie topotekanu aktywują nowe miejsca ori (inicjacji replikacji), położone w pobliżu miejsc już aktywowanych. Aktywacja ta zachodzi pomimo globalnego zahamowania replikacji. Systematyczne analizy dużej liczby komórek pozwoliły zaobserwować także znaczną heterogenność odpowiedzi poszczególnych komórek na stres replikacyjny wywołany przez inhibitor, pod względem całkowitej liczby miejsc replikacji DNA (zaobserwowano zarówno jej wzrosty, jak i spadki). Heterogenność odpowiedzi komórek w populacji wydaje się zjawiskiem powszechnym i coraz częściej opisywanym w literaturze dla różnych procesów fizjologicznych, dzięki rozwojowi metod do ilościowych analiz pojedynczych komórek w globalnej populacji. Tym samym badania Doktorantki wpisują się w aktualne trendy badań światowych.

Doświadczenia opisane w publikacji nr 4 są poprawnie zaplanowane i przeprowadzone, a ich wyniki starannie przeanalizowane i zinterpretowane. Podczas obrony, chciałabym jedynie poprosić o uzupełnienie informacji o doświadczeniach z obrazowaniem żywych komórek z białkiem PCNA w fuzji z EGFP. Czy wiadomo jaki wpływ na proces replikacji ma nadprodukcja tego białka, w tym nadprodukcja jego formy w fuzji z EGFP? Jaki duży był poziom nadprodukcji w zaprezentowanych doświadczeniach? Ponieważ nie używano linii stabilnie transfekowanej, a jedynie komórek po przejściowej transfekcji plazmidem kodującym białko PCNA w fuzji z EGFP, jak duża była zmienność w poziomie ekspresji transgenu i czy miała wpływ na wyniki eksperymentów?

**Perspektywy badawcze** są przedostatnim rozdziałem rozprawy, w którym Doktorantka interpretuje swoje dane w kontekście wiedzy literaturowej, jak również przedstawia kolejne wyniki, które nie zostały zamieszczone w publikacjach i stanowią podstawę do dalszych badań. Ta część rozprawy jest ilustrowana pięcioma rycinami, z czego cztery zawierają niepublikowane wyniki badań z wykorzystaniem super-rozdzielczej mikroskopii SMLM. Prezentowane wyniki stanowią kontynuację badań Doktorantki i dotyczą trzech aspektów, opisanych w osobnych podrozdziałach: (1) wzajemnej lokalizacji miejsc naprawy i replikacji DNA; (2) funkcji modyfikacji  $\gamma$ H2AX niezwiązanej z dwuniciowymi uszkodzeniami DNA; oraz (3) upakowania i modyfikacji potranslacyjnych chromatyny w miejscu naprawy DNA.



Zwłaszcza ten ostatni aspekt wydaje się fascynujący i otwierający szerokie perspektywy dzięki nowym metodom obrazowania modyfikacji histonów w żywych komórkach (techniki FabLEM oraz mintbody). Generalnie, ta część rozprawy dowodzi dużej wiedzy i dojrzałości naukowej Doktorantki, a także umiejętności stawiania pytań badawczych. Poprawnie skonstruowane, jednostronicowe **Podsumowanie** zamyka rozprawę.

### **Ocena edytorskiej strony rozprawy**

Wysoko oceniam rozprawę także pod względem edytorskim. Praca jest napisana poprawnym językiem polskim w częściach polskojęzycznych, z dużą starannością i praktycznie bez błędów literowych. Przygotowanie czterech anglojęzycznych publikacji jest profesjonalne i nie budzi zastrzeżeń.

### **Podsumowanie**

Rozprawa doktorska pani mgr Pauliny Rybak podejmuje istotny problem naukowy z dziedziny biologii komórki, jakim są powiązania pomiędzy procesami replikacji i naprawy DNA. W trakcie swoich badań Doktorantka wykazała się dużą wiedzą, umiejętnościami i sprawnością techniczną. Waga i znaczenie uzyskanych przez Doktorantkę wyników jest potwierdzona ich publikacją w renomowanych czasopismach międzynarodowych. Należy podkreślić, iż oprócz czterech prac włączonych do niniejszej rozprawy, pani mgr Rybak jest współautorką jeszcze pięciu dalszych publikacji, co jest wyróżniającym dorobkiem na Jej etapie kariery naukowej.

**Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Pauliny Rybak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na wysoką wartość rozprawy, potwierdzoną publikacjami wyników, wnioskuję o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.**

*Marta Mięczyńska*