

Celem projektu jest zbadanie, czy faza cyklu podziałowego, liczba jednoniciowych pęknięć DNA i nieobecność białka XRCC1 będą wpływały na aktywację ścieżki Long-Patch oraz Short-Patch odpowiedzialnych za naprawę jednoniciowych pęknięć DNA. DNA w komórkach żywych jest nieustannie narażone na uszkodzenia a najpowszechniejszym ich typem są jednoniciowe pęknięcia DNA (Single-Strand Breaks) powstające np. na skutek działania wewnątrz-komórkowych metabolitów czy reaktywnych form tlenu. Potencjalnie uznawane za niegroźne, nienaprawione, mogą zostać przekształcone w dwuniciowe pęknięcia DNA (DSBs – Double-Strand Breaks), które doprowadzić mogą do poważnych mutacji, karcynogenezy a nawet śmierci komórki. Dlatego też, bardzo ważne jest aby zrozumieć jak działają mechanizmy naprawiające tego typu uszkodzenia i co może wpływać na ich nieprawidłowe funkcjonowanie. Wyróżnić możemy dwie ścieżki naprawcze, Long-patch oraz Short-patch, które efektywnie radzą sobie z jednoniciowymi pęknięciami DNA. W literaturze znajduje się wiele informacji na temat różnych czynników wpływających na aktywację każdej ze ścieżek – dostępność ATP, funkcja pełniona przez komórkę, interakcje pomiędzy białkami naprawczymi czy rodzaj uszkodzenia, z którego SSBs powstały. Mało jest natomiast informacji dotyczących wpływu na ten proces fazy cyklu podziałowego, liczby uszkodzeń czy nieobecności kluczowego składnika jakim jest białko XRCC1. Eksperymenty, które były do tej pory przeprowadzane w celu zbadania wpływu tych czynników na naprawę SSB bazowały głównie na metodach biochemicznych (elektroforeza kometkowa, elucja alkaliczna) a do generowania pęknięć DNA wykorzystywano substancje uszkadzające DNA jak MMS, H₂O₂ lub promieniowanie widzialne X czy UV (nierzadko w obecności fotouczulaczy), które wywołują uszkodzenia wielu typów i w niekontrolowanej liczbie. Dodatkowo, bardzo często komórki były synchronizowane w cyklu podziałowym co również wywołuje stres komórkowy i uszkodzenia. Takie podejście badawcze utrudnia interpretację wyników i doprowadza do powstania w komórkach stanów dalekich od fizjologicznych – komórki w żywych organizmach nie są narażone na taką ilość uszkodzeń, stresu i nie są zazwyczaj poddawane działaniu wyżej wymienionych czynników. Dzięki opracowanej w naszym laboratorium metodzie generowania SSB przy pomocy skupionej wiązki światła widzialnego, jesteśmy w stanie uszkodzić komórkę w dowolnym miejscu jądra komórkowego. Manipulacja dawką całkowitej energii dostarczonej do jądra oraz czasem naświetlania daje duże możliwości w generowaniu uszkodzeń konkretnego typu (tylko SSB bez DSB i uszkodzeń oksydacyjnych). Nasza metoda daje możliwość zbadania procesów naprawy niewielkiej liczby SSB w pojedynczych komórkach bez konieczności użycia innych czynników uszkadzających. W planowanych eksperymentach będziemy generować pęknięcia DNA w komórkach HeLa 21-4 z ekspresją białek występujących na różnych etapach naprawy SSBs (PCNA, LIGI, LIGIII, XRCC1) gdzie LIGI oraz LIGIII będą markerami kolejno ścieżki LP i SP. Białko PCNA, ulokowane w fabrykach replikacyjnych, które przyjmują charakterystyczne wzory w zależności od fazy cyklu, posłuży za marker fazy S i komórek niereplikujących. Oprócz tego, generować będziemy w komórkach rosnącą liczbę uszkodzeń, aby sprawdzić jak wiele SSBs jednocześnie komórka może naprawiać. O informację o tym, czy pula białek ścieżki SP i LP jak XRCC1 może zostać wysyciona przez zbyt dużą liczbę uszkodzeń. Ostatnim krokiem będzie wygenerowanie jednoniciowych pęknięć DNA przy pomocy szoku cieplnego (możliwość uszkodzenia dużych populacji komórek w jednym czasie) w komórkach z częściowym i całkowitym knockout'em genu XRCC1. Sprawdzony zostanie przebieg procesu naprawy jednoniciowych pęknięć DNA i ich konwersji w DSBs pod nieobecność kluczowego składnika naprawy – białka XRCC1. Badania będące przedmiotem tego projektu dostarczą nowych istotnych informacji dotyczących podstawowego procesu jakim jest naprawa jednoniciowych pęknięć DNA, procesu, dzięki któremu zachowywana jest stabilność genomu a komórki potomne mogą otrzymać kompletną kopię DNA bez błędów. Ta tematyka badawcza została przeze mnie podjęta ponieważ uważam iż, naprawa DNA to jeden z kluczowych procesów, niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania każdego żywego organizmu. Dobra znajomość tych mechanizmów może przyczynić się w przyszłości do stworzenia nowych terapii przeciwnowotworowych i tym samym wpłynąć na poprawę jakości życia wielu ludzi. Co więcej, nowe podejście, do tego typu eksperymentów, które zastosujemy, pozwoli przetestować istniejące obecnie hipotezy badawcze związane z naprawą SSB alternatywnymi metodami.