Zeszyt Studentów Biotechnologii

ACTA MYGENICA

numer 16

Kraków, grudzień 2019

Zespół redakcyjny
Artur Blat
Dajana Dominiak
Zuzanna Głowacka-Grzyb
Małgorzata Honc

Okładka
Komórki ludzkiego glejaka wybarwione: falloidyną (filamenty aktynowe, sygnał zielony), Hoechstem 33342 (jądro komórkowe, sygnał niebieski) oraz przeciwciałem monoklonalnym anty-PDL1 sprzęgniętym z fluorochromem APC (ekspresja PD-L1, sygnał czerwony).
Autor zdjęcia: dr Barbara Pucelik, wykonano w Małopolskim Centrum Biotechnologii

Skład
Artur Blat

Korekta
Zespół redakcyjny

Wydawca
KNSB Mygen

Nakład: 500 szt.

Kontakt
acta.mygenica@gmail.com

ISSN 1899-5535

Sfinansowane przez

RADA KÓŁ NAUKOWYCH
UNIWERSYTETU
JAGIELLOŃSKIEGO

Od redakcji

Drodzy czytelnicy!

Witamy Was na łamach szesnastego numeru Acta Mygenica. Zachęcamy Was do zapoznania się obecnymi w tym wydaniu artykułami, dzięki którym dowiecie się m. in. za co została przyznana Nagroda Noba w dziedzinie fizjologii lub medycyny w tym roku, jak również o wykorzystaniu cytometrii obrazowej do detekcji i oceny ilościowej uszkodzeń DNA w komórkach.

Życzymy miłej lektury!

ZESPÓŁ REDAKCYJNY

Koło Naukowe Studentów Biotechnologii „Mygen” działające przy Uniwersytecie Jagiellońskim, we współpracy z Kołem Naukowy Genetyki, serdecznie zapraszają studentów i doktorantów na

VI Ogólnopolską Konferencję Genetyczną

Zaproszenia skierowane są do młodych badaczy i pasjonatów kierunków przyrodniczych interesujących się różnymi dziedzinami genetyki, zarówno prowadzących własne badania jak i dopiero zaczynających swoją przygodę z nauką. Oprócz wystąpień uczestników konferencji, odbędą się także wykłady zaproszonych gości – wybitnych naukowców i znaczącym dorobku naukowym w tej dziedzinie.

Sesje wykładowe i posterowe drugiego dnia konferencji (sobota) odbędą się w języku angielskim.

Konferencja odbędzie się w dniach 24-26 kwietnia 2020 r. w Krakowie
w Instytucie Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego przy ul. Gronostajowej 9.

Termin zgłoszeń abstraktów upływa 24 marca 2020 r.

www.genomica.pl

Masz pytanie? Napisz do nas!
genomica.uj@gmail.com

Z życia koła

Acta Mygenica powraca do Was po raz kolejny.

Nowy semestr rozpoczęliśmy Walnym Zebraniem, które przyciągnęło wielu młodych adeptów biochemii, biofizyki i biotechnologii. Serdecznie witamy ich w Naszym gronie i cieszymy się, że nasze Koło się powiększa.

Plan działalności Koła na ten rok akademicki jest ambitny. Kontynuujemy organizację seminariów czwartkowych, na których zapraszani goście przybliżają nam najbardziej interesujące aspekty life science. Ruszyły też przygotowania do kolejnej edycji naszych flagowych projektów. Komitety Organizacyjne VI Ogólnopolskiej Konferencji „Genomica" i Life Science Dla Licealistów już teraz dbają, aby tegoroczne edycje również okazały się sukcesem.

Nie zapominamy również o integracji – wspólny wyjazd do Mszany Dolnej można zdecydowanie uznać za udany. Piękna pogoda, góry, ognisko, a także wykłady zaproszonych gości umiliły październikowy weekend członkom Naszego koła. Trwają przygotowania do wspólnego warzenia Mygenowego piwa. Przed nami także spotkanie z planszówkami, a gdy tylko ruszy sezon łyżwiarski na pewno będzie można spotkać nas na lodowisku.

Zespół redakcyjny, Zarząd Koła i Komisja Rewizyjna życzą naszym czytelnikom wszystkiego dobrego w ten jesienno-zimowy czas i serdecznie zapraszają do dalszej lektury naszych Zeszytów. (Z doświadczenia wiemy, że najlepiej jest zabrać się do tego z kubkiem gorącej herbaty.)

Małgorzata Honc

Nowinki ze świata nauki

ORGANY UŚPIONE W GŁĘBOKIM CHŁODZIE

Możliwość przeszczepu organów zawdzięczamy dwóm niezwykłym postępom naukowym: umiejętności manipulacji układem odpornościowym pacjenta oraz zdolności przechowywania narządów poza ciałem przez co najmniej kilka godzin. Podczas gdy strategie immunosupresji uległy znacznemu rozwojowi, postęp w ochronie narządów był do tej pory niewielki. Obecnie transportowane organy ochładza się do ok. 2°C w celu spowolnienia aktywności metabolicznej, co pozwala na zachowanie ich właściwości przez kilka godzin. Zasady termodynamiki mówią jednak, że czas ten można znacznie przedłużyć poprzez obniżenie temperatury, co niefortunnie skutkowałoby powstaniem kryształów lodu. Jak rozwiązać ten problem? Naukowcy stworzyli nową metodę, zwaną supercoolig. Polega ona na stopniowym i ostrożnym schładzaniu organów przy zastosowaniu skomplikowanego systemu dostarczania do wnętrza narządów roztworów m.in. glikolu polietylenowego i trehalozy oraz poprzez zminimalizowanie kontaktu cieczy z powietrzem wewnątrz organu. Pozwoliło to na przechowanie ludzkiej wątroby w -4°C przez 27 h z zachowaniem jej funkcjonalności. Przed naukowcami stawiane są nowe wyzwania – kolejnym krokiem będzie znalezienie metod wykorzystujących ultraniskie temperatury kriogeniczne, co może zrewolucjonizować medycynę transplantacyjną.

Dajana Dominiak

Bibliografia

Fuller, B. J., Petrenko, A., & Guibert, E. (2019). *Human organs come out of the deep cold*. Nature Biotechnology. doi:10.1038/s41587-019-0264-2

NAGRODY NOBLA 2019

Tegoroczna Nagroda Nobla 2019 w dziedzinie fizjologii i medycyny trafiła do Brytyjczyka Sir Petera J. Ratcliffe'a oraz Amerykan Williama G. Kaelina Jr. i Gregga L. Semenzy. Naukowcy zajmowali się badaniem sposobu wykrywania i dostosowywania się do stężenia tlenu przez komórki.

Kluczową odpowiedzią organizmu na hipoksję jest zwiększenie ekspresji genu kodującego hormon zwany erytropoetyną (EPO), co prowadzi do nasilonej produkcji erytrocytów. Grupy badawcze prowadzone przez Semenzę i Ratcliffe'a jeszcze w ubiegłym wieku dowiodły, iż gen EPO jest regulowany przez poziom tlenu oraz że mechanizm wykrywania tlenu obecny jest nie tylko w komórkach wątroby, gdzie produkowany jest hormon EPO, lecz niemalże

we wszystkich tkankach. Późniejsze badania Semenzy pozwoliły zidentyfikować konkretne czynniki transkrypcyjne regulujące gen EPO – jednym z nich jest białko HIF-1α , które stymuluje gen EPO w stanie hipoksji, jednak przy wysokich stężeniach tlenu występuje w bardzo małych ilościach.

W tym samym czasie Kaelin prowadził badania dotyczące genu VHL w komórkach rakowych. Dzięki tym badaniom udało się wykazać, iż białko VHL przyczynia się do degradacji czynnika HIF-1α. W roku 2001 grupy badawcze Kaelina i Ratcliffe'a niezależnie opublikowały artykuły dotyczące wpływu ilości tlenu na modyfikację HIF-1α umożliwiającą oddziaływanie tego białka z VHL, tym samym wyjaśniając mechanizm wykrywania poziomu tlenu.

Wykrywanie poziomu tlenu gra dużą rolę w wielu chorobach – odkrycia laureatów otworzyły drogę do dalszych badań dotyczących leczenia chorób takich jak anemia czy nowotwory.

Agnieszka Maślanka

Bibliografia

https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2019/press-release/ [dostęp: 20.11.2019 r.]

Spis treści:

Białko NRT1.1 (NPF6.3) jest kluczowe dla efektywnej gospodarki rolnej

Hubert Kasprzak 9

Wykorzystanie cytometrii obrazowej do detekcji i oceny ilościowej uszkodzeń DNA w komórkach

Dawid Skoczek 15

Białko NRT1.1 (NPF6.3) jest kluczowe dla efektywnej gospodarki rolnej

Hubert Kasprzak
Zakład Fizjologii Molekularnej Roślin
Wydział Nauk Biologicznych
Uniwersytet Wrocławski
hubertvon@gmail.com
Praca napisana pod opieką: prof. dr hab. Grażyny Kłobus

Azot obok węgla, wodoru, tlenu, fosforu i siarki jest pierwiastkiem biogennym oddziaływującym na wzrost i rozwój roślin. Występuje on w glebie, w postaci zarówno organicznej, jak i mineralnej. Wchodzi w skład związków o podstawowym znaczeniu dla wszystkich organizmów: kwasów nukleinowych, aminokwasów, białek, nukleotydów transportujących energię. Poza rolą żywieniową niektóre formy azotu (NO_3^- , NO) mogą także działać jako cząsteczki sygnałowe regulujące bardzo wiele procesów. Są to m. in. regulacja ekspresji genów, wzrost rośliny, struktura systemu korzeniowego, rozwój liści, stan spoczynku nasion, a także czas zakwitania. Rośliny wykształciły wiele przystosowań dających im możliwość rozwoju w warunkach wahającego się stężenia azotu w glebie. Główną rolę w żywieniu roślin odgrywają azotany, które są najbardziej obfitym źródłem azotu na glebach uprawnych. Z tego względu pobieranie, transport i redystrybucja NO_3^- stały się głównym celem współczesnych badań. W ciągu ostatniej dekady bardzo dużo dowiedzieliśmy się, w jaki sposób azot jest pobierany ze środowiska i transportowany do różnych części rośliny. Zrozumienie w jaki sposób wpływa on na fizjologię roślin znacząco poprawi efektywność upraw, a także zmniejszy jego negatywne skutki dla środowiska, takie jak eutrofizacja czy produkcja gazów cieplarnianych. Wiadomo, że w pobieraniu i transporcie azotanów uczestniczą białka należące do czterech rodzin. Jedną z nich jest rodzina NRT1/NPF. U *A. thaliana* zidentyfikowano 12 genów należących do rodziny NRT1 Szczególnie interesujący jest, gen *NRT1.1* (*AtNPF6.3*), którego produkt może pełnić funkcję transportera azotanów zarówno wysokiego, jak i niskiego powinowactwa w zależności od ich stężenia. Jest on także odpowiedzialny za samo wykrywanie azotanów, a poprzez to regulację ekspresji genów kodujących liczne białka metabolizmu azotanowego.

Wstęp

Mineralne formy azotu są pobierane przez włośniki korzenia, a czasem także poprzez strzępki mikoryzowego symbionta. W zależności od stężenia jonów w roztworze glebowym rośliny wykorzystują do ich pobierania dwa

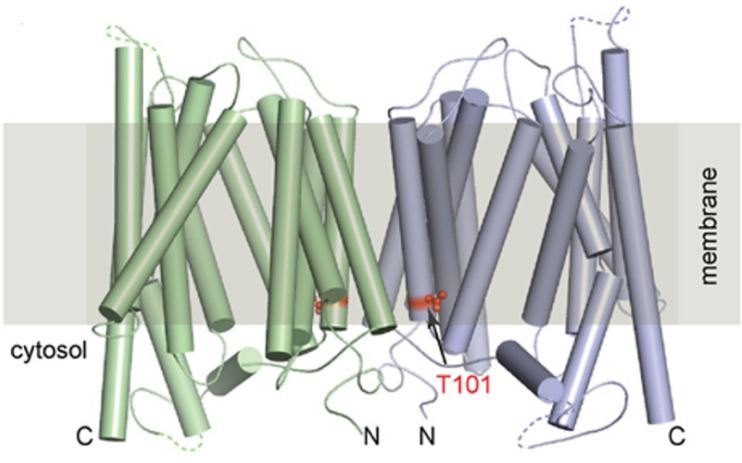
systemy różniące się powinowactwem. Są to systemy oparte na transporterach należących do rodziny LATS (ang. *low affinity transport system*) i HATS (ang. *high affinity transport system*). Transportery LATS wykazują niskie powinowactwo do substratu i w związku z tym transportują go przy jego wysokim stężeniu. W przeciwny sposób funkcjonują transportery HATS działające wyłącznie w niskich stężeniach substratu i wykazujących do niego wysokie powinowactwo. Główną rolę w żywieniu roślin odgrywają jednak azotany, które są najbardziej obfitym źródłem azotu na glebach uprawnych. Z tego względu pobieranie, transport i redystrybucja NO_3^- stały się głównym celem współczesnych badań. Badania termodynamiki reakcji przyswajania formy NO_3^- wykazały, że forma ta pobierana jest wyłącznie aktywnie, nawet podczas jego obecności w glebie w bardzo wysokim stężeniu. Transport NO_3- jest sprzężony z transportem protonów, a jego wydajność zależy bezpośrednio od aktywności plazmolemowej pompy protonowej, H^+ ATP-azy. W konsekwencji, w warunkach niskiego pH łatwiej jest przyswajalna forma azotanowa. Jeśli przyjrzymy się danym dotyczącym kinetyki reakcji pobierania azotanów to zauważymy, że w transporcie uczestniczą trzy typy białek różniące się właściwościami kinetycznymi: dwa z nich wykazują wysokie powinowactwo do substratu, natomiast trzeci z nich charakteryzuje niskie powinowactwo do substratu. Wśród białek o wysokim powinowactwie do azotanów jeden kodowany jest przez geny, których ekspresja jest indukowana substratem (NO_3-) i dlatego znany jest jako indukowany wysoko specyficzny system transportu (iHATS). Cechą charakterystyczną drugiego typu jest to, że geny kodujące białka tej grupy ulegają ekspresji konstytutywnie (cHATS). Białka cHATS maja znacznie większą specyficzność substratową od iHATS, choć są mniej przepustowe. Mechanizm o niskiej specyficzności (LATS) ma szczególne znaczenie przy wyższych stężeniach azotanów (>1mM) w środowisku, podczas gdy przy niskim stężeniu azotanów roztworach glebowych w pobieraniu uczestniczą białka systemów HATS [1].

Rola NRT1.1 (NPF6.3) w pobieraniu i relokacji NO_3^- w roślinach wyższych

Wyróżniamy 2 rodziny białek biorących udział w procesach transportu azotu: transportery azotanowo/azotynowe (NNP, ang. *nitrate – nitrite porters*) i transportery peptydowe PTR (ang. *peptide transporters*). Występują one nie tylko w komórkach eukariotycznych, ale także prokariotycznych i mają zbliżoną budowę. Analizy struktury aminokwasowej białek NRT1/NPF sugerują, że tworzą one 12 helis transbłonowych połączonych krótkimi pętlami hydrofilowymi. Wyjątkiem jest duża pętla hydrofilowa łącząca helisy transbłonowe 6 i 7 [2]. Przez długi czas członków różnych rodzin białek transporterowych nazywano w zależności od tego, jaki ich substrat został w pierwszej kolejności zidentyfikowany. Przykła-

dowo dla NRT1 były to azotany, dla białek AIT - kwas abscysynowy, a dla GTR – glukozynolany. Dopiero później okazało się, że niektóre z nich transportują więcej substratów.

Członkowie rodziny NRT1 (transportery azotanowe1/ transportery peptydowe) u roślin wykazują bardzo dużą homologię względem rodziny peptydowych transporterów zwierząt (SLC15/ PepT/ PTR/POT). W porównaniu jednak z nimi mają znacznie niższą specyficzność substratową i transportują większą grupę związków. U roślin początkowo zostały one uznane za transportery azotanów, a także peptydów. W ostatnich latach odkryto jednak inne ich substraty takie jak: azotyny, jony chlorkowe, auksyna, kwas abscysynowy, jasmoniany czy gibereliny [3]. U *A. thaliana* jedno z najlepiej poznanych białek należących do tej rodziny – NRT1.1 pełni dwie istotne funkcje. Po pierwsze jest ono transporterem azotanowym, który w zależności od warunków środowiskowych może wykazywać niskie bądź wysokie powinowactwa do azotanów. W związku z tym, że początkowo wykazano, iż posiada ono dużą homologię z innymi członkami rodziny NRT1 działającymi na zasadzie transporterów o niskim powinowactwie, do tej właśnie grupy został zaliczony. Dalsze badania wykazały jednak, że mutanty NRT1.1 u roślin wykazywały ograniczone przyswajanie azotanów w warunkach ich niskiego, egzogennego stężenia. Obecnie wiemy, iż przy stężeniach odpowiednio niskich (50 µM) białko NRT1.1 działa jako transporter o wysokim powinowactwie, natomiast przy wyższym stężeniu (4 mM) jako transporter o niskim powinowactwie do substratu. Zmienność powinowactwa jest regulowana poprzez fosforylacje reszty tyrozylowej w pozycji 101 (Thr101) białka, która umożliwia rozpad dimeru wykazującego niskie powinowactwo do substratu (element systemu LATS) odpowiadającego za transport o niskim powinowactwie na dwa monomery o wysokim powinowactwie do azotanów (elementy systemu HATS) (*Ryc. 1*), [4]. Transporter ten wys-



Ryc. 1. Dimer białka NRT1.1 z zaznaczoną resztą Thr101 [4].

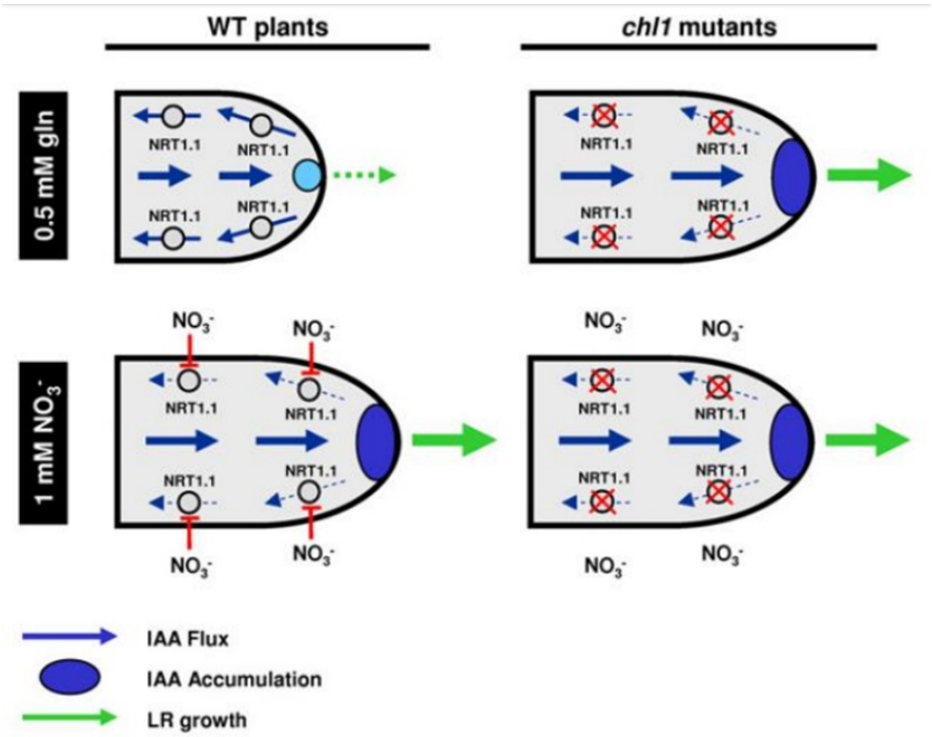
tępuje nie tylko w komórkach epidermy, ale także kory pierwotnej, endodermy, komórek przyszparkowych i wielu innych [5].

Rola NRT1.1 (NPF6.3) w transporcie hormonów roślinnych

Coraz więcej dowodów wskazuje na to, że oprócz azotanów, białka NPF transportują szeroką gamę innych, często odmiennych strukturalnie substratów komórkowych.
W związku z tym, fizjologiczna funkcja tych białek nie ogranicza się tylko do transportu azotanów przez błony, ale jest dużo bardziej złożona i niezwykle istotna dla procesów wzrostowych i rozwojowych roślin. Poza azotanami związkami transportowanymi przez nie są między innymi: auksyna, kwas abscysynowy, gibereliny i jasmoniany [6]. Kluczową rolę w transporcie auksyny odgrywa białko AtNPF6.3 (AtNRT1.1). Zdolność ta jest hamowana w obecności wysokiego stężenia azotanów. Umożliwia to modulowanie wzrostu korzeni bocznych. Akumulacja auksyny w tkankach spowodowana niemożnością jej transportu powoduje wzrost tkanek [5]. Białko AtNPF6.3 (AtNRT1.1) wraz z innymi białkami takimi jak AtNPF4.6 (NRT1.2), AtNPF4.5 (AtAIT2), AtNPF4.1 (AtAIT3), AtNPF5.7 pełni funkcję transportera kwasu abscysynowego. Mutanty AtNFP4.6 posiadają niższą temperaturę tkanek na skutek częstszego otwarcia aparatów szparkowych. Potwierdza to zdolność owego białka do transportu ABA.

Rola NRT1.1 (NPF6.3) w percepcji azotowego sygnału środowiskowego i regulacji architektury korzeniowego

Głównym indykatorem azotanów w środowisku jest NPF6.3 (NRT1.1). Mutant NRT1.1 charakteryzuje się między innymi ograniczonym przyrostem korzeni bocznych. Warto dodać, że pobieranie azotanów i indukcja odpowiedzi na nie u *A. thaliana* są to odrębne procesy. Potwierdza to zachowanie normalnej indukcji odpowiedzi na wzrost stężenia azotu przy jednoczesnej niemożności jego pobierania u mutantaz pojedynczą substytucją aminokwasową w genie NPF6.3. Aktywność NPF6.3 (NRT1.1) jest regulowana poprzez CBL9 (ang. *Calcineurin B-like protein 9*) - CIPK23 (ang. *CBL-interacting protein kinase 23*), który w warunkach niskiego stężenia NO_3^- fosforyluje NPF6.3 (NRT1.1), a przez to hamuje aktywność tego transportera. Z kolei białko CIPK8 promuje strategię transportu niskiego powinowactwa pod wpływem wysokiego stężenia azota-nów, a także indukuje regulowaną stężeniem azotanów, ekspresję kilku genów [7] Typowym objawem niedoboru azotu w podłożu jest wykształcanie bardzo długiego, słabo rozgałęzionego korzenia, a także silne zahamowanie wzrostu rośliny [8]. Wysokie stężenie azotanów w środowisku promuje inhibicje aktywności AtNPF6.3 (NRT1.1) polegającą na transportowaniu auksyny w korzeniach bocznych. W konsekwencji hormon ten się w nich gromadzi



Ryc. 2. Schematyczny model transportera NRT1.1.

doprowadzając do ich wzrostu. Dodatkowo NO_3^- stymuluje transkrypcję AtNPF6.3 (AtNRT1.1), a także stabilność transkryptu tego genu. Jego produkt białkowy natomiast odmiennie działa na tkanki korzenia głównego, których wzrost inhibuje i zawiązki korzeni bocznych, których wzrost promuje [9]. Wpływ transportera NRT1.1 trafnie pokazuje *Ryc. 2*. Mutant chl1 nieposiadający owego transportera nie jest w stanie transportować auksyny przez co zalega ona w komórkach wierzchołka korzenia. W typie dzikim natomiast na skutek przetransportowania auksyny możliwe jest zahamowanie wzrostu korzenia, chyba że aktywność AtNPF6.3 (NRT1.1) będzie inhibowana wysokim stężeniem azotanów w środowisku [10].

Analiza sekwencji promotorowej NRT1.1 (NPF6.3) u *Cucumis sativus*

W celu wyznaczenia sekwencji promotorowej genu *CsNRT1*.1 przeszukano genom ogórka dostępny na stronie NCBI pod katem genu *CsNRT1.1* (HM772991). Wykorzystując bazę danych NCBI (GenBank) znalaziono sekwencję 1500 nukleotydów powyżej kodonu ATG, od którego rozpoczyna się sekwencja kodująca białko CsNRT1.1. Znajduje się ona na chromosomie 3 ogórka od 2319696 do 2321196 par zasad. Następnie poddana została ona analizie z użyciem programu *PlantCare* [11]. Umożliwia on analizę *in silico* sekwencji promotorowych w poszukiwaniu specyficznych elemen-

tów *cis*-regulatorowych. Analizując sekwencję promotora CsNRT1.1 znalaziono 20 elementów *cis*-regulatorowych. Większość motywów występuje w jednej kopii. Są to między innymi składniki systemu odpowiedzi na światło: Box 4, GTR1, LAMP-element i 3-AFR1. Wyjątkiem są występujące podwójnie motywy: ARE - odpowiadające za *cis*-aktywację podczas indukcji w warunkach beztlenowych, ERE i TATA oraz motywy zaliczane do tzw. promotora podstawowego, cis-aktywacyjne elementy wzmacniające, występujące aż w 33 powtórzeniach CAAT-box i 58 powtórzeniach TATA-box.

Podsumowanie

Dotychczasowe badania wykazały, że zdolność transportu azotanów oraz innych związków przez rośliny jest inna u różnych gatunków roślin i podlega regulacji przez czynniki środowiskowe. Regulacja ta odbywa się również poprzez zmieniające się stężenie azotanów w środowisku. Informacja ta jest wykrywana właśnie dzięki transceptorowi NRT1.1 (NPF6.3). Pozwala to na precyzyjną regulację ekspresji genów odpowiedzialnych nie tylko za metabolizm azotanowy, ale także regulacji architektury korzenia, czy innych procesów wzrostowych i rozwojowych roślin.

Bilbiografia

[1] O'brien JA, Vega A, Bouguyon E, et al. Nitrate Transport, Sensing, and Responses in Plants. Mol Plant. 2016;9(6):837-56.

[2] Tsay YF, Chiu CC, Tsai CB, Ho CH, Hsu PK. Nitrate transporters and peptide trans-porters. FEBS Lett. 2007;581(12):2290-300.

[3] Léran S, Varala K, Boyer JC, et al. A unified nomenclature of NITRATE TRANS-PORTER 1/ PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. Trends Plant Sci. 2014;19(1):5-9.

[4] Sun J, Zheng N. Molecular Mechanism Underlying the Plant NRT1.1 Dual-Affinity Nitrate Transporter. Front Physiol. 2015;6:386.5 (Wang i wsp., 2018).

[6] Corratgé-faillie C, Lacombe B. Substrate (un)specificity of Arabidopsis NRT1/PTR FAMILY (NPF) proteins. J Exp Bot. 2017;68(12):3107-3113.7 (Liu i wsp., 2015)

[8] Kopceweicz J., Lewak S. 2016. Fizjologia Roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN

[9] Bouguyon E, Perrine-walker F, Pervent M, et al. Nitrate Controls Root Development through Posttranscriptional Regulation of the NRT1.1/ NPF6.3 Transporter/Sensor. Plant Phys-iol. 2016;172(2):1237-1248.

[10] Krouk G, Lacombe B, Bielach A, et al. Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. Dev Cell. 2010;18(6):927-37.

[11] Lescot M, Déhais P, Thijs G, et al. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. Nucleic Acids Res. 2002;30(1):325-7.

Wykorzystanie cytometrii obrazowej do detekcji i oceny ilościowej uszkodzeń DNA w komórkach

Dawid Skoczek
Zakład Biotechnologii Medycznej/Małopolskie Centrum Biotechnologii
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie.
dawid.skoczek@gmail.com
Praca napisana pod opieką: dr. Krzysztofa Szade

Uszkodzenia DNA mogą powodować zaburzenia w funkcjonowaniu szlaków sygnałowych, zmieniać przenoszoną informację genetyczną, a w skrajnych przypadkach prowadzić do śmierci komórki. Źródłami uszkodzeń kwasu deoksyrybonukleinowego są różne czynniki zaliczane do kilku z klas, ze względu na swoje pochodzenie oraz na rodzaj wprowadzanych mutacji. Z uwagi na negatywne działanie mutagenów, w toku ewolucji komórki wytworzyły szereg mechanizmów mających na celu niwelowanie tych szkodliwych skutków. Za mechanizmy te odpowiadają skomplikowane kompleksy białkowe, którym towarzyszą ważne czynniki aktywujące oraz dezaktywujące określone elementy w obrębie szlaków sygnałowych. Punktem docelowym powyższych kompleksów naprawczych jest odzyskanie pierwotnego stanu DNA z jak najmniejszą ingerencją w przenoszoną informację genetyczną.

Świadomość bezpośredniego wiązania się struktur białkowych z naprawianym DNA stała się mobilizacją do poszukiwania metod mających na celu detekcję uszkodzeń DNA poprzez identyfikację połączonych z nim białek. Takie podejście pozwalało na łatwiejsze wyznaczanie miejsc uszkodzenia DNA, jednak stosowane metody obarczone były wieloma ograniczeniami zarówno pod względem oceny ilościowej jak i jakościowej. Ostatnie osiągnięcia z dziedziny techniki pozwoliły połączyć mikroskop fluorescencyjny z cytometrem przepływowym w jedno urządzenie, tworząc cytometr obrazowy. Pozwala on uzyskać obraz pojedynczej komórki w wielu kanałach przy jednoczesnej analizie, w tym statystycznej całych populacji komórek.

Niniejsza praca wykorzystuje zalety nowatorskiej technologii cytometrii obrazowej wraz z klasycznymi immunocytochemicznymi metodami detekcji elementów komórki w celu oceny ilościowej uszkodzeń DNA wywołanych in vitro czynnikami fizyczno-chemicznymi. Zastosowany sposób detekcji ma charakter pośredni – uszkodzenia struktury kwasu deoksyrybonukleinowego potwierdzone testem kometowym zostają wykryte

poprzez oznaczanie lokalizacji białek odpowiedzialnych za jego naprawę w miejscu przyłączenia do struktury DNA.

Wstęp

a) Podwójne i pojedyncze pęknięcia DNA oraz modele ich naprawy

Pojedyncze (ang. SSB – *single strand breaks*), a szczególnie podwójne (ang. DSB – *double strand breaks*) pęknięcia DNA są jednym z najbardziej szkodliwych uszkodzeń materiału genetycznego, zatem muszą zostać szybko naprawione w celu zachowania informacji genetycznej [1]. Organizmy eukariotyczne są wyposażone w kilka różnych mechanizmów naprawczych obejmujących między innymi rekombinację homologiczną (ang. HR – *homologous recombination*) i niehomologiczne łączenie się końców (ang. NHEJ – *non-homologous end joining*) [2].

- NHEJ jest procesem naprawiającym większość uszkodzeń typu DSB i zachodzi we wszystkich etapach cyklu komórkowego. System ten obejmuje modyfikację i ligację uszkodzonych końców z zachowaniem niewielkiej homologii w celu szybkiej naprawy DNA. Powoduje to wprowadzenie małych delecji lub insercji co przy istotności dokładnego odwzorowania uszkodzonego DNA nie jest pożądane [3].
- Mechanizm HR wymaga natomiast rozległego repozycjonowania białek i matrycy naprawczej. Jest przeprowadzany w komórkach eukariotycznych na kilka różnych sposobów, większość z nich zależy od rozpoznawania i łączenia uszkodzonych końców DNA z nieuszkodzonymi sekwencjami homologicznymi występującymi na chromatydach siostrzanych lub locus alleliczym [3].

Uszkodzenia DNA są powodowane różnymi czynnikami zarówno endogennymi jak i egzogennymi. Do przykładowych czynników egzogennych należą etopozyd i promieniowanie UV, które w opisywanym eksperymencie zostały wykorzystane w celu wyindukowania uszkodzeń DNA w komórkach linii HEK293.

b) UV i etopozyd jako czynniki wywołujące uszkodzenia DNA

Etopozyd jest związkiem organicznym hamującym działanie topoizomerazy II poprzez zablokowanie jej możliwości do ligacji dwóch fragmentów DNA, co ostatecznie skutkuje powstawaniem podwójnych pęknięć DNA (DSB). Oprócz generowania DSB przyczynia się on też do powstania pojedynczych pęknięć DNA (SSB) [4]. Związek ten dodatkowo indukuje tworzenie się wolnych rodników, które mają potencjalną zdolność modyfikacji guaniny do 8-oksoguaniny [5].

Promieniowanie ultrafioletowe jest promieniowaniem elektromagnetycznym, którego długość fali przypada na 100 do 400 nm. Ze względu na skutki działania UV na organizmy żywe wyróżnia się jego trzy podklasy: UV-A, UV-B oraz UV-C. Podtyp UV-C jest najbardziej destrukcyjny dla organizmów, ponieważ długość jego fali przypada na maksimum absorpcji ważnych związków biologicznych. Ekspozycja na promieniowanie UV tworzy głównie

fotoprodukty dipirymidynowe, a dwuniciowe pęknięcia DNA (DSB) powstają jedynie pośrednio przy naprawie innych uszkodzeń [6,7]. Zostało również udowodnione, że naświetlanie komórek promieniowaniem UV tworzy wolne rodniki, które reagując z guaniną obecną w kwasach nukleinowych powodują jej modyfikację do 8-oksoguaniny. 8-oksoguanina ma zdolność do tworzenia par z adeniną zaburzając informację genetyczną [5].

c) Cytometria obrazowa – charakterystyka i zastosowanie

U podstaw cytometrii obrazowej leży połącznie cytometru przepływowego z mikroskopem fluorescencyjnym w jedno urządzenie. Kombinacja tych dwóch technik umożliwia ilościową analizę na poziomie pojedynczej komórki jak ma to miejsce w klasycznej cytometrii przepływowej, a dzięki analizie obrazu, w tym fluorescencyjnego, pozwala na wykonanie wielokanałowego zdjęcia każdej pojedynczej komórce przepływającej przez cele pomiarową [8]. Cytometria obrazowa pozwala nie tylko na ilościową analizę sygnału, ale także na analizę przestrzenną. Detekcja sygnału odbywa się w kilku kanałach, wśród których można wyróżnić: kanały obrazujące komórkę w jasnym polu, kanały SSC (ang. *Side Scatter*) niosące informację o strukturze (ziarnistości) komórki oraz kanały analizujące emisję fluorescencji [8]. Dzięki zastosowaniu takiego spektrum elementów detekcyjnych możliwe jest na przykład uzyskanie informacji na temat lokalizacji białek w komórce poprzez analizę fluorescencji związanych z nimi znakowanych fluorochromami przeciwciał lub modyfikowaniu tych białek poprzez dodanie domeny emitującej fluorescencje. Możliwe jest też bezpośrednie obrazowanie kwasów nukleinowych w komórce, w tym celu stosuje się fluorescencyjne barwniki wiążące się do DNA lub RNA.

Ogólna zasada działania cytometrii obrazowej jest następująca: fluorochrom związany z komórką przepływającą przez układ cytometru zostaje wzbudzony wiązką lasera o zadanej długości fali, a jego emisja zostaje zarejestrowana zgodnie z jego charakterystyką spektralną. Liczba i emisja stosowanych laserów oraz system optyczny określa liczbę fluorochromów, których sygnał może być jednocześnie rejestrowany [8].

Podsumowując, funkcjonalność cytometrii przepływowej wynika z analizy ilościowej sygnału na poziomie pojedynczej komórki wraz z dużą przepustowością. Połączenie zalet cytometrii przepływowej z możliwością rejestrowania obrazu pojedynczej komórki w różnych kanałach niesie ze sobą nowe zastosowania. Natomiast należy podkreślić, że metoda ta jest mniej przepustowa niż klasyczna cytometria przepływowa, a jakość uzyskanych obrazów jest niższej rozdzielczości w porównaniu do typowej mikroskopii fluorescencyjnej.

Cel pracy

Celem pracy było opracowanie systemu do detekcji uszkodzeń i systemów naprawczych DNA w oparciu o cytometrię obrazową. W tym celu użyto

protokół oparty na indukcji uszkodzeń DNA w komórkach HEK293 przez etopozyd i UV. Następnie dokonano analizy wybranych markerów uszkodzeń i naprawy DNA z wykorzystaniem *Image Stream* firmy *Amnis*.

Metodyka

a) Hodowla komórek HEK293

Komórki hodowano w inkubatorze, w którym panowały stałe warunki: 20% O_2, 5% CO_2, 37°C. Naczyniem hodowlanym były szalki o średnicy 10 cm. Na każdą z nich przypadało 8 ml pożywki, której bazą był DMEM (Gibco) o zawartości glukozy 4,5 mg/ml z 10% dodatkiem surowicy wołowej (ang. FBS – *fetal bovine serum*) (Biowest) i penicyliną oraz streptomycyną - 100 jednostek/ml (Gibco). Do doświadczenia przygotowano w sumie 22 takie szalki komórek o konfluencji wynoszącej 85%. Wykonano jedno powtórzenie eksperymentu.

b) Barwienia immunofluorescencyjne

Wszystkie kolejne procedury wykonywano w temperaturze pokojowej, a wirowanie odbywało się zawsze przy 220 g przez 5 minut, natomiast użyty PBS (ang. phosphate buffered saline) (Biowest) nie zawierał jonów Ca^{2+} i Mg^{2+}. Do blokowania użyto 3% BSA (ang. bovine serum albumin) (Sigma) w PBS z 0,05% Tritonem (Sigma).

Przygotowane grupy badawcze i kontrolne:

- Grupa badawcza – 10 szalek z komórkami naświetlanymi UV i inkubowanymi z etopozydem, które były następnie inkubowane kolejno z przeciwciałami I i II rzędowymi.
- Grupa kontrolna I – 10 szalek z komórkami nienaświetlanymi UV bez inkubacji z etopozydem, które były następnie inkubowane z przeciwciałami I i II rzędowymi.
- Grupa kontrolna II – 2 szalki z komórkami naświetlanymi UV i inkubowanymi z etopozydem. Do zawiesiny komórek z jednej szalki zostały dodane tylko przeciwciała II rzędowe anty-mysie, a do drugiej zawiesiny anty-królicze. Próba została wykonana z uwagi na fakt, że wśród testowanych dziesięciu przeciwciał pierwszorzędowych dwa przeciwciała są pochodzenia mysiego, a 8 króliczego (*Tab. 1*)

Tuż przed wykonaniem barwień w grupie badawczej i grupie kontrolnej II zmieniono pożywkę na zawierającą etopozyd (20 µg/ml) i poddano inkuba-

Tabela 1. Spis zastosowanych przeciwciał

Nr	Nazwa, producent	Rodzaj, organizm	Zastosowanie
1	anty-jednoniciowy DNA (Enzo)	monoklonalne, mysie	Pozwala na wyrycie obecności deoksycytydyny ssDNA.
2	anty-p-Chk2 (fosforylowane na S33/35) (abcam)	monoklonalne, królicze	Wiąże się do fosfokinazy punktu kontrolnego numer 2 cyklu komórkowego, która przyłącza się do uszkodzonego DNA, głównie w obrębie podwójnych pęknięć (DSB). Fosforylacja na S33/S35 zachodzi po uszkodzeniu DNA.
3	anty-ATR (fosforylowane na T1989) (abcam)	poliklonalne, królicze	Rozpoznaje kinazę białkową seryna/treonina ATR, która w sytuacjach stresu genotoksycznego fosforyluje szereg białek zaangażowanych w odpowiedź na uszkodzenie DNA, w tym histon gH2AX na Ser139 w miejscach uszkodzenia DNA, regulując tym samym mechanizm odpowiedzi na uszkodzenie DNA
4	fosfo-ATM (fosforylowane na S1981) (R&D Systems)	poliklonalne, królicze	Rozpoznaje kinazę białkową (ATM). ATM pod wpływem uszkodzeń DNA ulega fosforylacji na Ser1981 co powoduje, że ulega rozpadowi do monomerów.
5	anty-ATR (abcam)	monoklonalne, królicze	Rozpoznaje białko ATR niezależnie od fosforylacji.
6	TIF1beta (Cell Signaling Technology)	monoklonalne, królicze	Wiąże się do czynnika transkrypcyjnego 1 beta, który odpowiada za aktywację transkrypcji genów w odpowiedzi na sygnały środowiskowe lub przebudowę chromatyny. Fosforylacja TIF1beta na Ser842 zachodzi w sposób zależny od ATM w odpowiedzi na stres genotoksyczny i jest niezbędna dla relaksacji chromatyny, która z kolei jest wymagana do odpowiedzi na uszkodzenie DNA.
7	ATF-4 (D488) (Cell Signaling Technology)	monoklonalne, królicze	Rozpoznaje czynnik transkrypcyjny ATF-4, indukowany podczas stresu siateczki cytoplazmatycznej, jak również podczas uszkodzenia DNA indukowanego przez cisplatynę. Reguluje ekspresję genu Ape1 zaangażowanego w naprawę DNA.
8	KAP-1 (S824) (abcam)	poliklonalne, królicze	Rozpoznaje białko KAP-1 związane z regulacją heterochromatyny. Jest fosforylowane przez ATM na Ser824 w odpowiedzi na uszkodzenie DNA i akumuluje się w miejscach uszkodzenia.
9	anty-Chk2 (abcam)	poliklonalne, królicze	Podobnie jak przeciwciało numer 2 wiąże się do Chk2, natomiast niezależnie od fosforylacji.
10	anty-8-oksoguaniuna (abcam)	monoklonalne, mysie	Wiąże się do 8-oksoguaniny w DNA. Guanina pod wpływem reaktywnych form tlenu, ulega konwersji do 8-oksoguaniny, co w rezultacie może prowadzić mutacji.

cji, najpierw dziesięciominutowej w cieplarce, a następnie półgodzinnej pod laminarem, w czasie której odkryte szalki poddawano działaniu UV. Komórkom z grupy kontrolnej I również zmieniono medium na niezwierające etopozydu i inkubowano równolegle do próby badawczej bez wpływu UV. Po inkubacjach komórki ze wszystkich szalek zebrano z użyciem trypsyny (Gibco) o stężeniu 0,25% i przeniesiono do próbówek typu FACS tak, aby zawiesina komórek z jednej szalki trafiła do jednej probówki. Całość zwirowano i następnie usunięto supernatant. Kolejno komórki zawieszono w 100 µl PBS, dodano 100 µl 4% paraformaldehydu (Sigma), inkubowano 5 minut, zwirowano. Nadsącz zlano, dodano 100 µl roztworu PBS z 0,2% dodatkiem Triton X100 (Sigma) i inkubowano 5 min. Dodano 1 ml PBS i wirowano. Supernatant zlano, dodano przeciwciała pierwszorzędowe w ilości 100 µl każde rozcieńczone w 3% BSA w stosunku objętościowym 1:200 i dodano je do komórek grupy badawczej i grupy kontrolnej I, tak żeby na jedną próbkę z grupy kontrolnej I i grupy badawczej przypadał jeden rodzaj testowanych przeciwciał, inkubowano 30 min w temperaturze pokojowej i zwirowano. Supernatant zlano, przygotowano po 100 µl roztworu przeciwciał drugorzędowych w 3% BSA w PBS w stosunku 1:400 i dodano je do wszystkich 20 probówek. Do próbek, do których wcześniej dodano przeciwciała pierwszorzędowe królicze trafiło przeciwciało drugorzędowe anty-królicze, a tam gdzie mysie, przeciwciało anty-mysie. Do jednej z próbek grupy kontrolnej II dodano roztworu przeciwciał drugorzędowych anty-mysich, a do drugiej anty-króliczych. Inkubowano 30 minut, dodano 1 ml PBS i zwirowano, nadsącz zalano zawieszono je w 100 µl PBS z dodatkiem 2% FBS. Próbki badano w cytometrze obrazowym *ImageStream*.

c) Elektroforeza kometowa

Procedurę przeprowadzono z użyciem komórek HEK293 na podstawie protokołu zamieszczonego z zestawem odczynników do elektroforezy kometowej (zestaw #4250-050-K, Trevigen). Przed rozpoczęciem wykonywania protokołu komórki inkubowano w cieplarce przez 10 minut z pożywką zawierającą etopozyd (20 µg/ml), a następnie inkubowano je pół godziny pod laminarem gdzie naświetlano je UV. Po inkubacji komórki zebrano za pomocą trypsyny (Gibco) o stężeniu 0,25% i poddano lizie alkalicznej. Po zakończeniu doświadczenia analizę przeprowadzono w programie *OpenComet* [9].

d) Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono w programie *Graphpad*. W przypadku analiz z wykorzystaniem cytometrii obrazowej w każdej grupie badano od kilkuset do kilkunastu tysięcy wstępnie wybramkowanych komórek. Dla każdej analizy uzyskano wartość średnią liczby spotów wraz z odchyleniem standardowym, natomiast na rycinach przedstawiono różnicę pomiędzy średnimi wartościami liczby spotów w grupie stymulowanej i niestymulowanej.

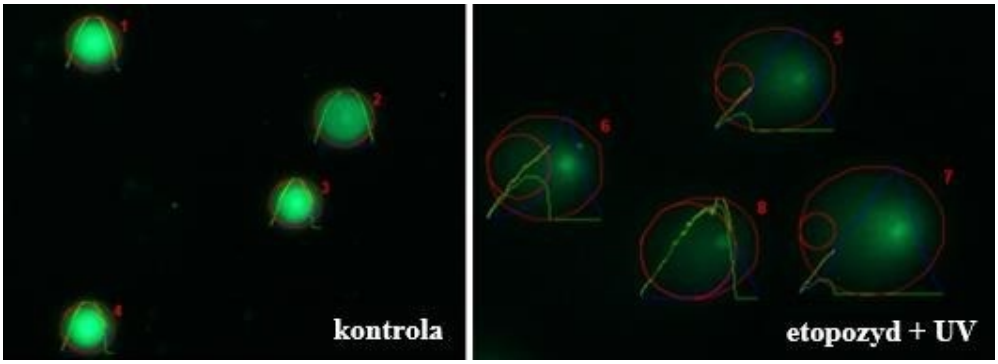
Wyniki

a) Ocena skuteczności indukcji uszkodzeń DNA.

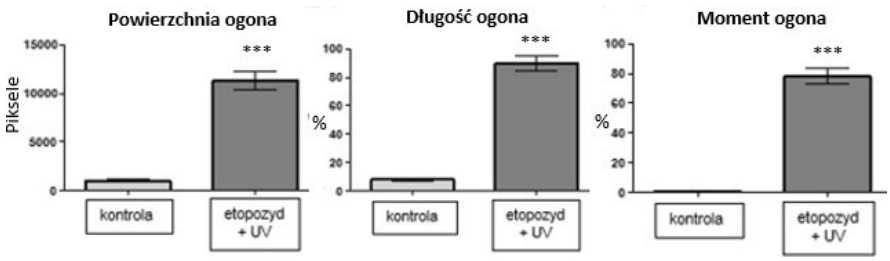
Aby potwierdzić istnienie uszkodzeń DNA indukowanych etopozydem i UV opartym o stosowany protokół w pierwszej kolejności przeprowadzono elektroforezę kometową w wersji alkalicznej, która jest uznawana za bezpośrednią metodę oceny uszkodzeń DNA [10]. Miała ona na celu bezpośrednie potwierdzenie uszkodzeń materiału genetycznego poprzez analizę obszaru ogona, jego momentu i długości w kometach komórkowych. Jak zaprezentowano, wyniki elektroforezy kometowej potwierdziły (*Ryc. 1*; *Ryc. 2*), że zastosowany etopozyd i UV są induktorami utraty ciągłości nici DNA.

b) Analiza obrazu barwionych komórek

Przedstawione poniżej zdjęcia pokazują białka naprawy DNA, które jak wdać koncentrują się lokalnie w miejscu uszkodzenia tworząc tak zwane spoty (ang. foci) (*Ryc. 3*). Celem pracy była ilościowa analiza, czyli zliczenie ilości spotów odpowiadającym akumulacji białek naprawczych w miejscu uszkodzeń DNA. W tym celu wykorzystano program *Ideas* i szukano parametrów, które pozwoliłyby na utworzenie masek porównujących liczbę spotów w komórkach, a następnie ich zliczanie.

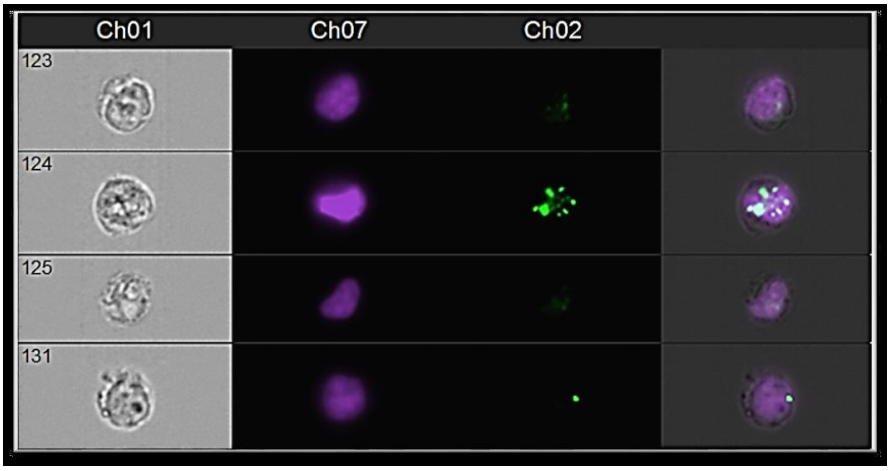


Ryc. 1. Zdjęcia komórek HEK293 wraz z zaznaczonymi badanymi parametrami po elektroforezie kometowej. Na zielono został wybarwiony DNA jądrowy.



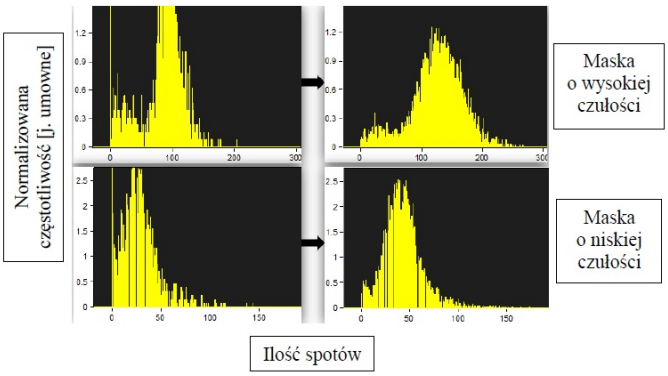
Ryc. 2. Elektroforeza kometowa – wyniki pomiarów.

*** - $p<0.001$; test t-studenta.

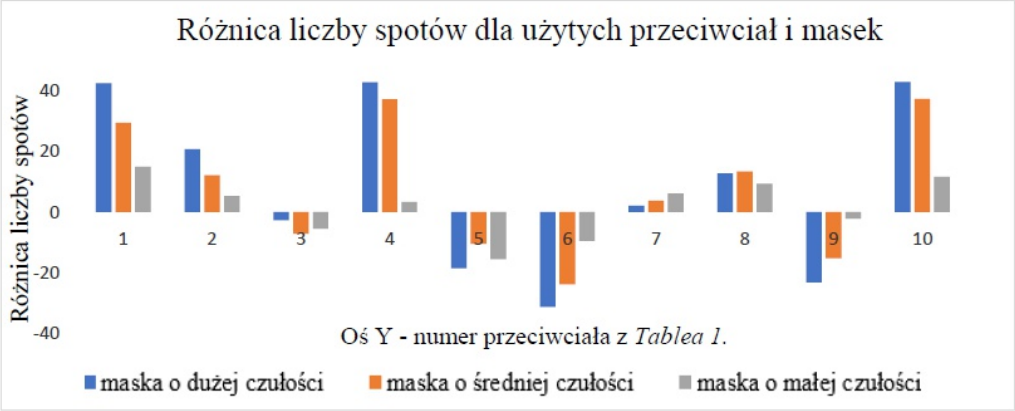


Ryc. 3. Fragment ekranu analizy zdjęć badanych komórek.
Opis kanałów: Ch01 – jasne pole, Ch07 – DAPI (wybarwiony DNA jądrowy), Ch02 – FITC (8-oksoguanina), ostatnia kolumna – wszystkie kanały połączone.

Stworzono trzy maski: o niskiej, średniej i wysokiej czułości. Każda z tych masek jest algorytmem uwzgledniającym intensywności fluorescencji oraz minimalną powierzchnie obszaru zakwalifikowaną jako odrębny spot. Maska o niskiej czułości wykrywała duże spoty objawiające się silnym sygnałem, maska wysokiej czułości analizuje małe spoty, które objawiają się słabym sygnałem, natomiast maska średniej czułości reprezentuje klas pośrednią pomiędzy wcześniej wymienionymi maskami. Maski były tworzone na podstawie arbitralnie wybranych komórek wykazujących dużą, średnią i małą ilość spotów. Ostatecznie na podstawie empirycznych ustawień pokazano, że pomimo wysokiego tła, algorytm o wysokiej czułości wykazywał większą różnicę spotów pomiędzy grupą niestymulowaną, a grupą stymulowaną (*Ryc. 4*).



Ryc. 4. Liczba spotów dla maski o dużej czułości i niskiej czułości na przykładzie przeciwciała anty-jednoniciowy DNA.
Kolumna pierwsza – grupa niestymulowana UV i etopozydem, kolumna druga – grupa stymulowana.



Ryc. 5. Różnica liczby spotów dla poszczególnych typów przeciwciał i zastosowanych masek.

c) Analiza wyników

Otrzymane wyniki dla każdego typu przeciwciała opracowano odejmując ilości spotów dla poszczególnych masek próby badawczej (komórki naświetlane UV i inkubowane z etopozydem) od próby kontrolnej (komórki nie naświetlane UV i bez inkubacji z etopozydem). Całość danych została zanalizowana i obliczona w programie *Imgaes* (*Ryc. 5*).

Wnioski i dyskusja wyników

Podsumowując, przeprowadzona analiza z wykorzystaniem cytometrii obrazowej pozwoliła na detekcję i ilościową ocenę białek, które są związane z uszkodzeniami DNA oraz markerów uszkodzeń DNA po stymulacji etopozydem i UV. Wśród analizowanych białek i markerów można wyróżnić trzy grupy:

a) W układzie badawczym barwienie z użyciem przeciwciał rozpoznających jednoniciowe DNA, fosfo-ATM (S1981) oraz 8-oksoguaninę, osiągnęło największą różnicę spotów pomiędzy próbą badawczą, a kontrolną. Jednoniciowe DNA oraz fosfo-ATM (S1981) to klasyczne markery uszkodzeń DNA dlatego ich silna ekspresja w stworzonym układzie eksperymentalnym była spodziewana. Obecność sygnału pochodzącego od 8-oksoguaniny może świadczyć o stosunkowo wysokim stężeniu reaktywnych form tlenu powodujących modyfikację guaniny do formy 8-oksoguaniny [5].

b) Sygnał od przeciwciał: p-Chk2 (S33/35), ATF-4 (D488) i fosfo-KAP-1 (S824) był widoczny lecz słabszy - analizowana różnica liczby spotów waha się w tej grupie od 2,14 do 20,84. Może to świadczyć, że przy takich warunkach eksperymentu i w tym typie komórek, białka wykrywane przez te przeciwciała lub ich fosforylowane formy nie biorą udziału w odpowiedzi na uszkodzenia DNA albo potrzebują więcej czasu na rozpoczęcie procesów naprawczych.

c) Przeciwciała: anty-p-Chk2 (fosfo T1989), anty-ATR, TIF1beta, wykazały większą obecność markerów naprawy w próbach kontrolnych niż badaw-

czych. Różnica w ilości spotów pomiędzy próbą badawczą, a kontrolną wynosi od -2,72 do -31,37 dla maski o wysokiej czułości. W przypadku Chk2 widać, że spada ilość całkowitego białka niezależnie od jego fosforylacji, natomiast rośnie ekspresja formy fosforylowanej S33/S35, co jak pokazano jest związane z odpowiedzią na uszkodzenia DNA [11]. Pozostałe białka (ATR oraz TIF1beta) wykazują inną kinetykę aktywności w odpowiedzi na uszkodzenia DNA niż pozostałe analizowane mechanizmy. Jednoznaczna interpretacja tego wyniku jest trudna, jednakże widać, że same uszkodzenia mają wpływ na zmianę ekspresji tych markerów.

Otrzymane wyniki potwierdzają, że można wykorzystać cytometrię obrazową do optymalnej, ilościowej oceny markerów naprawy oraz uszkodzeń DNA.

Bibliografia

[1] A. Mehta, J.E. Haber, Sources of DNA Double-Strand Breaks and Models of Recombinational DNA Repair. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014

[2] A. Kakarougkas, P. A. Jeggo, DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism. Br J Radiol, 2014 [3] W. J. Cannan, D. S. Pederson, Mechanisms and Consequences of Double-Strand DNA Break Formation in Chromatin. J Cell Physiol. 2016

[4] A. Muslimović, S. Nyström, Y. Gao, O. Hammarsten, Numerical Analysis of Etoposide Induced DNA Breaks. PLos One. 2009

[5] E. M. Aldred, C. Buck, K. Vall, Pharmacology A Handbook for Complementary Healthcare Professionals. 2009, s41-52

[6] K. S. Oh, M. Bustin, S. J. Mazur, E. Appella, K. H. Kraemer, UV-induced histone H2AX phosphorylation and DNA damage related proteins accumulate and persist in nucleotide excision repair-deficient XP-B cells. DNA Repair (Amst). 2011

[7] R. Greinert, B. Volkmer, S. Henning, E. W. Breitbart, K. O. Greulich, M. C. Cardoso, A. Rapp, UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages. Nucleic Acids Research. 2012

[8] E. K. Zuba-Surma, M. Kucia, M. Ratajczak, Technologia ImageStream - krok dalej niż Cytometria przepływowa. Postępy Biologii. 2007, tom 34, s361-376 [9] B. M. Gyori, G. Venkatachalam, P. S. Thiagarajan, D. Hsu, OpenComet: an automated tool for comet assay image analysis. Redox Biol. 2014 [10] Y. Lu, Y. Liu, C. Yang, Evaluating In Vitro DNA Damage Using Comet Assay. J Vis Exp. 2017

[11] G. Buscemi, L. Carlessi, L. Zannini, et al. DNA damage-induced cell cycle regulation and function of novel Chk2 phosphoresidues. Mol Cell Biol. 2006

Publikacja w Acta Mygenica XVI

Zachęcamy do publikacji w kolejnym numerze Zeszytów Naukowych "Acta Mygenica" Koła Naukowego Studentów Biotechnologii "Mygen". Akceptujemy artykuły przeglądowe i badawcze o tematyce z zakresu lifescience. Najlepsze z nadesłanych artykułów zostaną opublikowane w **XVII wydaniu** "Acta Mygenica" w czerwcu 2020. Termin nadsyłania abstraktów mija 10 maja, natomiast artykułów oraz zgód opiekuna naukowego - 17 maja 2020 r.

W razie pytań prosimy o kontakt z Arturem Blatem.
(acta.mygenica@gmail.com).

Poprzednie edycje zeszytów naukowych „Acta Mygenica” oraz szczegółowe informacje są dostępne pod adresem:
www.mygen.wbbib.uj.edu.pl/dzialalnosc/actamygenica