

Warszawa, 04.05. 2016

Prof.dr hab. Iwona Fijałkowska

Instytut Biochemii i Biofizyki

Polskiej Akademii Nauk

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Karola Kramarza pt. "Rola ortologów Rad5 w naprawie DNA u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*" wykonanej w Zakładzie Genetyki i Fizjologii Komórki Instytutu Biologii Eksperymentalnej Uniwersytetu Wrocławskiego

Rozprawa wykonana pod kierunkiem prof. Dr hab. Roberta Wysockiego i dr hab. Doroty Dziadkowiec napisana w języku polskim, składa się ze Wstępu, Celu pracy, opisu Materiałów i Metod, Wyników, Dyskusji, Wniosków, wyszczególnionej cytowanej Literatury oraz Streszczenia w języku polskim i angielskim. Duża część wyników przedstawionych w pracy doktorskiej została opublikowana w wysoko cenionych czasopismach – *Nucleic Acids Research* w 2013 roku oraz w *DNA Repair* w 2014 roku. Jeszcze jeden manuskrypt jest w recenzji.

Celem przedstawionej rozprawy doktorskiej Pana mgr Karola Kramarza było zbadanie roli ortologów białka Rad5, białka Uls1 z drożdży piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae* oraz białek kompleksu Rrp1-Rrp2 z drożdży rozszczepkowych *Schizosaccharomyces pombe*, w naprawie DNA związanej ze stresem replikacyjnym.

Badania nad białkiem Uls1 i białkami kompleksu Rrp1-Rrp2 są prowadzone już od kilku lat, z dużym powodzeniem, przez grupy Pani dr hab. Doroty Dziadkowiec i Pana Prof. Dr hab. Roberta Wysockiego. Prezentowana rozprawa przedstawia wyniki będące kontynuacją badań obu zespołów.

Białko Uls1 wydaje się pełnić ważne funkcje w komórce, ponieważ analiza jego budowy i funkcjonowania wskazuje na różnorodne aktywności enzymatyczne. Białko to zostało zakwalifikowane do rodziny SWI2/SNF2 i może funkcjonować jako translokaza usuwająca rekombinazę Rad52 z dwuniciowego DNA. Wykazano, że posiada charakterystyczną dla ligaz ubikwityny domenę RING i cztery motywy interakcji z SUMO, a więc może należeć do SUMO-zależnych ligaz ubikwityny – STUbL. W dużej mierze, właśnie badania „grupy wrocławskiej” wykazały, że komórki niosące delecję genu *ULS1* wykazują szereg interesujących, z punktu widzenia analizy mechanizmów stabilności genetycznej, fenotypów jak np. spowolnienie

progresji fazy S, opóźnienie szybkości odtwarzania prawidłowej struktury chromosomów po traktowaniu czynnikiem uszkodzającym DNA, zwiększoną poliubikwitynację PCNA w odpowiedzi na uszkodzenia w DNA, zmniejszenie wrażliwości szczepu z nieaktywną helikazą Sgs1 na czynniki genotoksyczne, czy obniżenie częstości rekombinacji w rDNA w szczepach z delecją genu kodującego helikazę Sgs1.

Podobnie, ortologi białka Rad5 i białka Uls1 z drożdży *S. pombe* – białka Rrp1 i Rrp2 wydają się być zaangażowane w regulację rekombinacji homologicznej. Białka te posiadają domeny SWI2/SNF2 i Helicase C, charakterystyczne dla translokaz, ale też domenę RING występującą w ligazach ubikwityny. Białka Uls1, Rrp1 czy Rrp2 wydają się pełnić rolę SUMO-zależnych ligaz ubikwityny, a wchodząc w interakcję z SUMO mogą odgrywać istotną rolę regulatorów naprawy uszkodzeń replikacyjnych DNA.

Pierwsza część pracy poświęcona jest badaniom nad funkcjonowaniem białka Uls1. We wcześniejszych badaniach, Pani dr Cał-Bąkowska wykazała, że gen *ULS1* wykazuje epistatyczną interakcję z genem kodującym endonukleazę Yen1, dlatego też postanowiono sprawdzić, jaka jest zależność działania Uls1 od innej endonukleazy - Mus81. W potrójnym mutancie delecyjnym $\Delta mus81 \Delta uls1 \Delta yen1$ wykazano zwiększoną letalność komórek, nagromadzenie komórek o zaburzonej morfologii, hiperfosforylację Rad53 czy silne zaburzenia w segregacji chromosomów w porównaniu do podwójnych czy pojedynczych mutantów. Otrzymane dane wskazują na udział białka Uls1 w naprawie DNA, na drodze niezależnej od działania endonukleaz Yen1 czy Mus81. Podobnie, analizując morfologię komórek, pomiar czasu generacji czy wrażliwość na czynniki genotoksyczne wykazano, że białko Uls1 bierze udział w szlaku odpowiedzi na stres replikacyjny niezależnie od helikaz Mph1 czy Srs2. Uprzednie badania „grupy wrocławskiej” wykazały, że gen *ULS1* wykazuje istotne i ciekawe interakcje z genem helikazy *SGS1*. W celu sprawdzenia na jakiej drodze defekt genu *ULS1* powoduje supresję wrażliwości delecyjnego mutantu *sgs1* na czynniki genotoksyczne, przeprowadzono analizę epistatycznych interakcji genetycznych z genami kodującymi różne białka biorące udział w ścieżkach tolerancji uszkodzeń DNA. Wykazano istotną rolę białek homologicznej rekombinacji i postreplikacyjnej naprawy (Rad18, Rad5, Rad51, Rad57).

Wykazano uprzednio, że helikaza Sgs1 stabilizuje aktywny transkrypcyjnie region DNA kodujący RNA budujące podjednostki rybosomalne rDNA. Białko Fob1 kontroluje wzajemne blokowanie się replikacji i transkrypcji DNA w tym regionie. W regionie rDNA rekombinacja mitotyczna zachodzi z dużą częstością, zwłaszcza w szczepach z delecją *SGS1*. Delecja genu *ULS1* suprymuje ten fenotyp. Aby poznać rolę Uls1 w tym procesie izolowano i analizowano regiony rDNA w poszczególnych szczepach. Wykazano, że stabilizacja powtórzeń rDNA obserwowana w podwójnym mutancie delecyjnym *uls1 sgs1* nie zależy od aktywności białka Fob1. Dodatkowo, wykazano, że brak Uls1 nie ma wpływu na niestabilność rDNA obserwowaną w delecji genu *MUS81* kodującego endonukleazę czy na letalność szczepu niosącego

zarówno delecję genu kodującego helikazę Sgs1 i genu kodującego endonukleazę Slx1-Slx4. Podsumowując, otrzymane wyniki sugerują, że białko Uls1 stabilizuje rDNA na ścieżce zależnej od Slx1-Slx4.

Akumulacja nieprawidłowych produktów naprawy DNA w szczepach $\Delta sgs1 \Delta mus81$ powoduje efekt letalny, a inaktywacja rekombinacji homologicznej suprymuje ten fenotyp. Postanowiono sprawdzić, czy delecja genu *ULS1* będzie miała podobny efekt. Wykazano, że choć delecja genu *ULS1* suprymuje ten fenotyp to jednak potrójny mutant wciąż wykazuje zaburzenia w naprawie DNA.

W dalszej części rozprawy analizowano potencjalne biologiczne substraty białka Uls1. Wykazano, że helikaza Srs2, zarówno w formie sumoliowanej jak i nie sumoliowanej wchodzi w interakcję z białkiem Uls1, i jest substratem dla SUMO-zależnej ligazy Uls1. Badania wpływu delecji genu *ULS1* na toksyczny efekt nadekspresji *SRS2* po traktowaniu HU i MMS oraz wykazanie wiązania Uls1 z PCNA pozwoliły na wysunięcie hipotezy, że Uls1 może pełnić rolę regulatora kontrolującego przyłączanie Srs2 do PCNA poprzez modulowanie ilości sumoliowanej helikazy Srs2 w komórce. Idąc dalej tym tropem, Doktorant przeprowadzając szczegółowe analizy epistatyczne zaproponował model zakładający, że interakcja Srs2 z PCNA promuje naprawę rekombinacyjną z udziałem białek Rad51 i Rad5.

Oprócz badań dotyczących udziału Uls1 w naprawie drożdży *S. cerevisiae*, Doktorant prowadził podobne badania analizując funkcje ortologów białka Rad5 ale w drożdżach *S. pombe*. Badany był udział białek Rrp1-Rrp2 w homologicznej rekombinacji na drodze zależnej od mediatorów Swi5-Sfr1. Uprzednio opublikowane prace Pani dr hab. Doroty Dziadkowiec i współpracowników wskazywały na rolę kompleksu Rrp1-Rrp2 w odpowiedzi na stres replikacyjny, a zwłaszcza na szczególną rolę białek Rrp1 i Rrp2 w szczepach z delecją *RAD57*, gdy zahamowana jest homologiczna rekombinacja związana z kompleksem Rad55-Rad57. W prezentowanej Rozprawie rozpatrywano rolę kompleksu Rrp1-Rrp2 w stabilizacji widełek replikacyjnych czy odblokowywaniu widełek po zatrzymaniu syntezy. Wyniki otrzymane przy użyciu elektroforezy chromosomów w pulsacyjnym polu elektrycznym po traktowaniu hydroksymocznikiem wskazywały, że istotnie, białka Rrp1 i Rrp2 biorą udział w odpowiedzi komórki na stres replikacyjny. Analiza przebiegu cyklu komórkowego w szczepach z delecją genów *RRP1* i *RRP2*, a także z delecją *RAD57* wskazuje, że białka Rrp1 – Rrp2 biorą udział w odpowiedzi komórek na stres replikacyjny, ale w szlaku nie związanym z homologiczną rekombinacją i mediatorami Rad55-Rad57. Analiza wrażliwości na HU w szczepach nie posiadających białek Rrp1 i Rrp2 oraz niosących delecję genu *RAD57* i *RQH1* sugeruje, że kompleks Rrp1 – Rrp2 współdziała z helikazą Srs2 promując zależne od syntezy DNA parowanie nici (SDSA). Analiza sekwencji aminokwasowej obu białek Rrp pozwoliła na zlokalizowanie czterech ewentualnych motywów interakcji z SUMO oraz sekwencji charakterystycznej dla domeny RING. Dlatego też postanowiono sprawdzić czy białka Rrp są zaangażowane w regulację sumoliowanych białek. Analizowano akumulację ciężkocząsteczkowych białkowych koniugatów SUMO w szczepach

niosących delecję genów *RRP* i *RFP*. Wzrost ilości ciężkocząsteczkowych białkowych koniugatów SUMO w podwójnych mutantach delecyjnych oraz wyniki analizy epistatycznych interakcji genetycznych pomiędzy genami *RRP* i *RFP* sugerują udział białek Rrp w szlakach sumolacji. Czy planowane są inne, i jakie badania mające na celu wykazanie, że białka Rrp są zaangażowane w regulację sumoliowanych białek?

Czy podobnie jak w przypadku genu *ULS1*, w genach kodujących białka Rrp trudno jest skonstruować mutanty punktowe? A propos, czy wyizolowano nowe mutanty w *ULS1* (np. supresorowe mutanty letalnych konstrukcji genetycznych), a jeśli tak czy poznane są ich fenotypy? Jak *in vitro* można sprawdzić aktywność SUMO-zależnej ligazy ubikwityny?

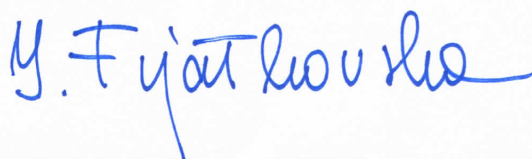
Czy można przeprowadzić analizę częstości i mechanizmu procesu homologicznej rekombinacji (inter i intra chromosomalnej?) w szczepach z delecją *RRP1RRP2* na drodze zależnej od mediatorów Swi5-Sfr1?

Rozprawę Pana Karola Kramarza oceniam bardzo wysoko. Została przygotowana nadzwyczaj starannie. Obrazuje wysoką ogólną wiedzę teoretyczną i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Wstęp umożliwia każdemu czytelnikowi, nawet nie związanemu tematycznie z zagadnieniami poruszonymi w Rozprawie, znakomitą orientację w badanej dziedzinie. Pomimo, że praca analizuje skomplikowane zależności funkcjonalne pomiędzy wieloma genami i systemami naprawy, napisana jest bardzo przejrzysto. Tabele i Rysunki są dobrze i jasno opisane. Każdy podrozdział sekcji Wyniki zawiera podsumowanie i wnioski, ułatwiające prześledzenie logiki pracy.

Wyniki prezentują eleganckie, prawidłowo zaplanowane eksperymenty, zaprezentowane w logiczny i przejrzysty sposób. Dyskusja przedstawiona w rozprawie doktorskiej świadczy o dużej wiedzy i dojrzałości naukowej Doktoranta. Zawiera odniesienia do najnowszych danych literaturowych. W Dyskusji przedstawiono dwa interesujące modele. Pierwszy, działania białka Uls1 w odpowiedzi na stres replikacyjny, drugi interakcji kompleksu Rrp1-Rrp2 z mediatorami ścieżek naprawy replikacyjnych uszkodzeń DNA na drodze homologicznej rekombinacji czy z helikazami Rqh1 lub Srs1.

Rozprawa ta spełnia wszelkie wymagania stawiane pracom doktorskim, stanowi oryginalne rozwiązanie przez autora zagadnienia naukowego, wykazuje jego ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie naukowej i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii Eksperymentalnej Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pana mgr Karola Kramarza do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Mając na uwadze ogólnobiologiczne znaczenie przeprowadzonych badań oraz udokumentowaną wartość naukową wyników opisanych w rozprawie chciałabym

również prosić Radę Naukową Instytutu Biologii Eksperymentalnej Uniwersytetu Wrocławskiego o wyróżnienie tej pracy.



prof. dr hab. Iwona J. Fijałkowska