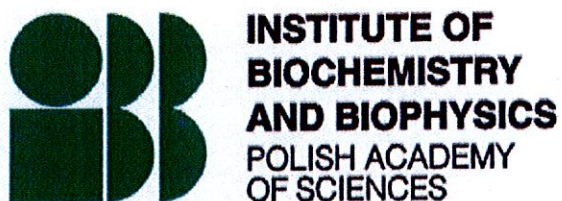


Warszawa, 20.10. 2019



Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, Poland

Prof.dr hab. Iwona Fijałkowska

Instytut Biochemii i Biofizyki

Polskiej Akademii Nauk

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Barg - Wojas pt. "Rola mediatorów homologicznej rekombinacji w utrzymaniu struktury centromerów u *Schizosaccharomyces pombe*" wykonanej w Zakładzie Biotransformacji, na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego**

Rozprawa wykonana pod kierunkiem dr hab. Doroty Dziadkowiec została przygotowana zgodnie z wymaganiami art.31 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym składa się ze streszczenia w języku polskim i angielskim, wstępu, celu pracy, opisu materiałów i metod, opisu wyników, dyskusji, podsumowania oraz wyszczególnionej cytowanej literatury.

Homologiczna rekombinacja DNA jest procesem angażującym wiele białek, wymagającym perfekcyjnej koordynacji w celu zachowania wierności powielanego materiału genetycznego. Proces ten jest wysoce konserwowany w organizmach eukariotycznych, dlatego też komórki drożdży *S. pombe* są doskonałym organizmem modelowym umożliwiającym szerokie badania genetyczne i biochemiczne. Głównymi białkami zaangażowanym w proces rekombinacji są białko Rad51 oraz Rad52, jednakże również ważne są białka wspomagające proces rekombinacji zwane mediatorami rekombinacji. W drożdżach rozszczepkowych dwa główne kompleksy białek mediatorowych wspomagają zależną od Rad51 inwazję nici: kompleks Rad55-Rad57 oraz Sfr1-Swi5. Grupa Pani dr hab. Dorota Dziadkowiec od wielu lat, z dużym sukcesem prowadzi badania dotyczące charakterystyki mediatorów rekombinacji. Badania te doprowadziły do zidentyfikowania w *S. pombe* kompleksu Rrp1-Rrp2, który działa w ścieżce zależnej od Sfr1/Swi5. Białka Rrp1 i Rrp2 są ortologami białka Uls1 z *Saccharomyces cerevisiae*, należące do rodziny translokaz SWI2/SNF2 i ligaz E3 ubikwityny STUbL posiadających motywy interakcji z SUMO,



rozpoznających i ubikwitynujących sumoliowane białka. Wcześniejsze badania grupy Pani dr hab. Doroty Dziadkowiec wykazały, że kompleks Rrp1-Rrp2 może negatywnie regulować mechanizmy rekombinacji zależnej od Rad51.

Wiele danych wskazuje na istotną rolę rekombinacji jako procesu wspomagającego powielanie materiału genetycznego zwłaszcza w rejonach „trudnych do replikacji” lub gdy proces replikacji nie przebiega prawidłowo. Rejony telomerowe i centromerowe posiadające wiele powtórzeń sekwencji, formują struktury drugorzędowe, a co za tym idzie są potencjalnymi obszarami utrudnień w procesie replikacji. Zatrzymania czy spowolnienia w przesuwaniu się widełek replikacyjnych promują zwiększenie częstości rekombinacji. Istotnie, wykazano zaangażowanie białek rekombinacyjnych oraz białek stresu replikacyjnego na przykład w utrzymanie integralności centromerów. W poprzednich pracach pokazano, że białka Rrp1 i Rrp2 wiążą się do rejonów zawierających uszkodzone DNA, co może oznaczać, że białka te są zaangażowane w warunkach zagrażających stabilności genomu.

Centromery odpowiedzialne są za prawidłowy rozdział chromosomów do komórek potomnych. W centralnym rejonie centromeru wiąże się centromerowy wariant histonu H3 (Cnp1 u *S. pombe*) z którym oddziałują białka kinetochoru. W obrębie centromeru nie występują geny kodujące białka i tworzy on strukturę heterochromatyny. Jak już wspomniano, skład nukleotydowy i formujące się struktury drugorzędowe utrudniają syntezę DNA. Zaprezentowana praca doktorska miała na celu zbadanie roli białek Rrp1 i Rrp2 w utrzymaniu stabilności centromerów.

Zanim przejdę do omawiania Wyników i Wniosków chciałabym pochwalić bardzo obszerny, przejrzysty napisany Wstęp. Doktorantka opisuje w nim wszystkie zagadnienia mające związek z prowadzonymi badaniami i tematyką rozprawy, ułatwia to swobodną lekturę kolejnych rozdziałów pracy. Cel pracy jasno przedstawia szereg zadań, które autorka zamierza zrealizować.

W poprzednich badaniach wykazano, że białka Rrp1 i Rrp2 związane są z procesem homologicznej rekombinacji. Aby dogłębniej poznać rolę białek Rrp1 i Rrp2 w utrzymaniu stabilności centromerów, badano, w szczepach nadprodukcujących Rrp1 i Rrp2 oraz w warunkach braku białek zaangażowanych w tworzenie struktury heterochromatyny, wrażliwość na tiabendazol, czynnik zaburzający polimeryzację mikrotubul, używany do testu niestabilności struktury centromerów. Wykazano negatywny wpływ nadprodukcji Rrp1 i Rrp2 na strukturę oraz transkrypcyjne wyciszenie obszaru centromerowego. Wykazano również, że Rrp1 i Rrp2 modulują poziom histonów w chromatynie. Obserwowany defekt manifestujący się zaburzeniami w segregacji chromatyny i wyciszeniem transkrypcyjnym obserwowany w szczepach z nadprodukcją Rrp1, a także w trochę mniejszym stopniu w warunkach nadprodukcji Rrp2, może być związany ze obserwowanym zmniejszeniem puli H3 i zmianami w lokalizacji Cnp1 oraz poziomu histonu H3 i H2B. Otrzymane wyniki pozwalają na zaproponowanie modelu sugerującego, że białka Rrp1 i Rrp2 wpływają na stabilność



centromerów modulując równowagę pomiędzy poziomami Cnp1 i H3 biorąc udział w usuwaniu histonu H3 z rejonu centromeru.

W prezentowanej rozprawie wykazano, że białka Rrp1 i 2 tworzą skupiska w jądrze komórkowym niezależnie od białek odpowiedzialnych za powstawanie struktury heterochromatyny. Co ciekawe, białka te wiążą się z rejonem centromeru, ale również, że Rrp1 wiąże się w rejonie powstania dwuniciowych pęknięć DNA, a Rrp2 z rejonami telomerowymi. W dalszych doświadczeniach, wykazano, że nadprodukcja tych dwóch białek powoduje zwiększenie śmiertelności komórek, zwiększenie ilości skupisk z udziałem Rad52, wzrost ilości histonu  $\gamma$ H2A, zaburzenia w segregacji chromosomu, wydłużenie i rozgałęzienie komórek i prawie pięciokrotne zwiększenie częstości utraty chromosomów. Według Doktorantki obserwowane zjawiska mogą sugerować aktywację punktów kontrolnych cyklu komórkowego. Czy sprawdzane były zmiany w poziomie modyfikacji postranslacyjnej innych aktywowanych białek?

Badania w warunkach nadekspresji zmutowanych form genów *rrp1+* i *rrp2+* z mutacją w domenie ATPazowej, w domenie RING oraz Rrp2 pozbawiony motywów interakcji z SUMO, nie wykazały zaburzeń produkcji czy lokalizacji białek. Można więc wnioskować, że aktywność translokazowa i ligazy ubikwityny są istotne dla funkcjonowania Rrp1 i Rrp2 i utrzymanie stabilności centromerów.

Doktorantka wykazała, że Rrp1 czy Rrp2 tworzą skupiska w jądrze komórkowym nawet jeśli komórki są pozbawione drugiego paraloga. Wyniki te oraz wyniki nadprodukcji poszczególnych białek w szczepach z delecją genu *swi6* wskazują, że białka te mogą funkcjonować niezależnie i w różnym stopniu wpływają na stabilizację struktury centromeru. Badania lokalizacji białek Rrp1 i Rrp2 przy użyciu immunoprecypitacji chromatyny pokazały, że wiążą się z centralnym rejonem centromeru. Wykazano również, że białka te pełnią inną rolę w sumolacji czy ubikwitynacji. Zaproponowano, że Rrp2 może chronić sumoliowane białka przed degradacją, natomiast Rrp1 wydaje się pełnić rolę SUMO-zależnej ligazy ubikwityny. Co ciekawe, Rrp2 zdaje się odgrywać istotną rolę w kształtowaniu stabilności telomerów.

W dalszej części pracy zidentyfikowano motywy w sekwencji Rrp1 wskazujące na możliwość oddziaływania z PCNA. Za pomocą immunoprecypitacji i Western blot wykazano, że rzeczywiście białkiem ubikwitynowanym w wyniku zwiększenia ilości Rrp1 jest PCNA. Dalsze badania pokazały, że białko te wiąże się do niezmodyfikowanej i ubikwitynowanej formy PCNA, jednakże Rrp1 zwiększa stosunek ubikwitynowanej formy PCNA do niezmodyfikowanej. Dokładna analiza tego zjawiska wskazała, że obserwowana ubikwitynacja zachodzi niezależnie od białek Rhp18 i Rad8, białek wchodzących w skład znanych kompleksów odpowiedzialnych za ubikwitynację PCNA. Zadano więc pytanie, jaka jest rola Rrp1 w procesie ubikwitynacji PCNA? Z przyjemnością mogę stwierdzić, że Doktorantka nie tylko analizuje precyzyjnie otrzymane wyniki, ale też proponuje w Dyskusji strategię prowadzenia dalszych badań mających na celu wyjaśnienie roli Rrp1 w



ubikwitynacji PCNA. W znakomicie napisanej Dyskusji przedstawiony jest również bardzo interesujący model analizujący udział białka Rrp1 w ubikwitynacji i potencjalnej proteosomalnej degradacji PCNA. Opierając się na otrzymanych wynikach oraz danych literaturowych Doktorantka bardzo dojrzałe analizuje funkcje białek Rrp1 i Rrp2 w utrzymaniu stabilności genomu w komórkach drożdży postulując, że białka Rrp1 i Rrp2 modulują ubikwitynację białek, wpływają na strukturę chromatyny, strukturę centromeru oraz regulują dynamikę histonów .

Podsumowując, prowadzone badania są bardzo ciekawe i ważne dla poznania mechanizmów kontrolujących stabilność materiału genetycznego. Zarówno zaprezentowane wyniki, wnioski i przeprowadzona dyskusja wskazują na znakomitą znajomość badanej tematyki, sprawność w stosowaniu różnorodnych metod oraz dojrzałość naukową Doktorantki.

Trochę w pracy zabrakło mi informacji jakie są fenotypy mutantów delecyjnych, jakie są fenotypy mutantów punktowych w poszczególnych domenach, a co za tym idzie, dlaczego używano warunków nadprodukcji białek Rrp1 i Rrp2? Poproszę też o przedyskutowanie, czy i do jakiego stopnia warunki nadprodukcji stwarzają zagrożenie nieprawidłowej interpretacji wyniku? Czy mierzono poziom mutagenyzy w szczepach nadprodukujących białka Rrp1 i Rrp2?

Rozumiem, że białka Rrp1 i Rrp2 łączą się do miejsc uszkodzonego DNA powstających w różnych miejscach genomu, jednak najsilniejszy efekt ich deregulacji obserwujemy w rejonach centromeru? Czy próbowano badać efekty nadprodukcji białek Rrp1 i Rrp2 w warunkach zwiększonej ilości dwuniciowych pęknięć DNA lub w innych rejonach chromosomu zawierających sekwencje powtórzone? Chciałabym również poprosić o porównanie funkcji białka Uls1 z *S. cerevisiae* z dostępnymi informacjami o funkcji białek Rrp1 i Rrp2 w *S. pombe*?

Na koniec chciałabym jeszcze dodać, że praca jest napisana bardzo starannie. Rysunki i tabele przedstawiające wyniki przygotowane są w przejrzysty sposób. Eksperymenty są prawidłowo zaplanowane, a wyniki zinterpretowane w interesujący sposób. Bardzo przekonująca jest również wybrana i zastosowana metodologia badań statystycznych. W cytowanej literaturze tylko w części pozycji podane są dane dla doi.

Podsumowując, otrzymane wyniki oraz zaprezentowaną rozprawę oceniam bardzo wysoko. Została przygotowana nadzwyczaj starannie. Zaprezentowane prace badawcze obrazują wysoką ogólną wiedzę i znajomość wielu technik biologii molekularnej. Rozprawa ta spełnia formalne wymogi stawiane pracom doktorskim określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i

tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz.1789 ze zm.), stanowi oryginalne rozwiązanie przez autorkę zagadnienia naukowego, wykazuje jej ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie naukowej i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Anny Barg-Wojas do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. Dr hab. Iwona J. Fijałkowska

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN