

Warszawa, 20 luty 2022
prof. dr hab. Iwona J. Fijałkowska
E-mail: iwonaf@ibb.waw.pl

OCENA PRACY DOKTORSKIEJ

PANA JAKUBA MURASZKO

**pt.: „Właściwości biochemiczne Rrp1 istotne dla utrzymania
stabilności genomu *Schizosaccharomyces pombe***

Precyzyjna naprawa i replikacja DNA są kluczowymi procesami zapewniającymi stabilność genomu. Jednym z ważniejszych procesów wpływających na stabilność materiału genetycznego jest rekombinacja homologiczna (HR). HR obejmuje szereg powiązanych ze sobą mechanizmów, które funkcjonują w naprawie DNA, zapewniają wsparcie dla replikacji DNA podczas ponownego uruchomienia zatrzymanych lub uszkodzonych widełek replikacyjnych, a także umożliwiają prawidłowy rozdział i przekazanie materiału genetycznego. Zaburzenie w funkcjonowaniu tych procesów prowadzi do niestabilności genetycznej stanowiąc przyczynę wielu chorób. Rekombinaza Rad51 pełni kluczową rolę w HR umożliwiając wymianę nici DNA. Rodzina genów *RAD51* jest ewolucyjnie konserwowana we wszystkich domenach życia, z zachowaną domeną rdzenia ATPazy. Podczas HR białko Rad51 tworzy na jednoniciowym DNA filament nukleoproteinowy, który jest stabilizowany przez różne białka nazwane mediatorami i stabilizatorami. Po odnalezieniu sekwencji homologicznej w obrębie siostrzanej chromatyd promowana jest inwazja nici DNA i formowanie pętli D. Koniec 3' inwazyjnej nici jest wykorzystywany jako starter do syntezy DNA, co prowadzi do odzyskania utraconej informacji genetycznej lub umożliwia kontynuację replikacji DNA. Jak już wspomniano, oprócz Rad51, które jest kluczowym białkiem w rekombinacji homologicznej, szereg innych białek jest zaangażowanych w ten proces. Białka Rrp1 i Rrp2, badane w recenzowanej pracy są mediatorami HR, homologami występującego w *Saccharomyces cerevisiae* białka Uls1 posiadającego domenę translokazy SNF2, należące do rodziny SUMO-zależnych ligaz.

Przedstawiona do oceny praca doktorska została wykonana w Zakładzie Biotransformacji na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego.

Promotorem pracy jest Pani dr hab. Dorota Dziadkowiec. Grupa Pani dr hab. Doroty Dziadkowiec już od kilku lat, z dużym powodzeniem, prowadzi badania roli mediatorów w prawidłowym przebiegu procesu HR. Celem zaprezentowanej do recenzji pracy doktorskiej było zbadanie udziału białka Rrp1 w regulacji funkcjonowania rekombinazy Rad51 w *Schizosaccharomyces pombe*.

Rozprawa napisana jest w języku polskim. Zawiera klasyczne dla prac doktorskich podrozdziały jak: Streszczenie w języku polskim i angielskim, Spis treści, Wstęp, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie wyników oraz Wykaz skrótów i Bibliografię.

WSTĘP jest napisany przejrzysto, nie jest przeładowany zbędnymi wiadomościami, wprowadza czytelnika w aktualny stan wiedzy, przedstawia dane literaturowe bezpośrednio związane z tematyką badań. Zaprezentowane schematy i rysunki są dobrze dobrane i ułatwiają analizę opisywanych procesów.

MATERIAŁY I METODY opisane są starannie i wyczerpująco. Użyte przez Doktoranta techniki świadczą o znajomości szerokiego spektrum stosowanych metod genetycznych, biochemicznych czy biofizycznych.

WYNIKI - pierwsza część pracy doktorskiej opisuje badania roli białek Rrp1 i Rrp2 w utrzymaniu stabilności genomu prowadzone *in vivo* w komórkach *S. pombe*. Wcześniejsze badania prowadzone w pracowni wykazały, że nadprodukcja białek Rrp1 i Rrp2 jest toksyczna dla drożdży, powoduje spowolnienie wzrostu, zmiany w segregacji chromosomów i w morfologii komórek. Wyniki te sugerowały spowolnienie cyklu komórkowego w warunkach nadprodukcji tych białek, co zostało udowodnione w recenzowanej pracy (Ryc.11). Uprzednie wyniki wskazywały również na zaburzenia przebiegu replikacji, co sugerowałoby możliwość zwiększonego występowania jednoniciowych fragmentów DNA. Aby to zbadać, Doktorant analizował ilość skupisk podjednostki kompleksu RPA, łączącego się z jednoniciowym DNA, w szczepach nadprodukujących białka Rrp1 i Rrp2. Wykazał, że w takich warunkach obserwuje się zwiększoną akumulację jednoniciowego DNA (Ryc. 12) potwierdzającą występowanie stresu replikacyjnego. Co więcej, wykazał, że białka Rrp1 i Rrp2 kolokalizują z podjednostką kompleksu RPA (Ryc. 13), co wskazuje na funkcję białek Rrp1 i Rrp2 w regionach jednoniciowego DNA. Jak już wspominałam wcześniej, prawidłowe funkcjonowanie białka Rad51 jest niezwykle istotne dla utrzymania stabilności genetycznej. We wcześniejszych pracach wykazano, że translokazy tj. helikaza Rdh54, Uls1 czy Rad54 mają wpływ na funkcjonowanie Rad51, dlatego też w przedstawionej pracy postanowiono sprawdzić wpływ Rrp1 i na działanie tej rekombinazy. Zwiększona akumulacja Rad51 powoduje nadmierne wydłużanie komórek, defekty w segregacji chromosomów czy spowolnienie wzrostu. Doktorant wykazał, że delecja genu *RRP1* nasila ten efekt, powoduje zwiększenie efektu zahamowania wzrostu, natomiast nadprodukcja Rrp1 (ale nie Rrp2) obniża ten efekt (Ryc. 14 i 15). Wyniki te sugerowały znaczenie białka

Rrp1 w regulacji funkcjonowania Rad51. Wykazano wcześniej, że białko Rrp1 posiada domeny charakterystyczne dla białek mediatorowych - domenę RING oraz domenę ATPazowej translokazy. W następnych doświadczeniach analizując wpływ zmiany aminokwasowej w domenie ATPazowej translokazy Rrp1 Doktorant wykazał, że aktywność ta jest istotna dla regulacji działania rekombinazy Rad51 (Ryc. 18). Natomiast zmiany aminokwasowe w domenie RING białka Rrp1, związanej z aktywnością ligazy ubikwitynowej, miały znacznie słabszy efekt. Wyniki te sugerowały, że podobnie jak translokazy Rdh54, Rad54 czy Uls1 białko Rrp1 może być zaangażowane w usuwanie Rad51 z DNA. Aby potwierdzić tę hipotezę badano lokalizację Rrp1 i Rad51 oraz częstość występowania włókien Rad51. Wykazano, że Rrp1 kolokalizuje z białkiem Rad51, zapobiega występowaniu Rad51 w postaci włókien. Wykazano, że zarówno nadprodukcja białka Rrp1 typu dzikiego jak i Rrp1^{D397AE398A} nie wpływa na poziom Rad51. Natomiast w szczepach niosących zmianę aminokwasową w domenie RING białka Rrp1 obserwowano wzrost ilości Rad51 i jego akumulację w obrębie jądra komórkowego. Otrzymane przez Doktoranta wyniki wskazują na znaczenie aktywności ligazy ubikwitynowej Rrp1 w funkcjonowaniu Rad51 (Ryc. 19, 20, 21,22). Następnie, za pomocą koimmunoprecypitacji Doktorant wykazał, że Rrp1 i Rad51 formują wspólny kompleks (Ryc. 37). Otrzymane *in vivo* wyniki wyraźnie wskazywały na zależności w funkcjonowaniu Rad51 i Rrp1. Dalsze badania tych zależności Doktorant prowadził w doświadczeniach *in vitro* używając oczyszczonych białek.

Doktorant aby zrealizować te ambitne plany musiał opracować metodę oczyszczania białka Rrp1 a następnie zoptymalizować warunki nadprodukcji przy zachowaniu stabilności i rozpuszczalności białka (Ryc 23- 32). Doktorant znakomicie wywiązał się z tego trudnego zadania uzyskując zarówno wersję typu dzikiego jak i zmienione w domenie RING białko Rrp1.

Na wstępie badań *in vitro* Doktorant wykazał, że obecność domeny ATPazowej w białku Rrp1 powoduje hydrolizę ATP w obecności jedno- i dwuniciowego DNA (Ryc. 33). Następnie pokazano wiązanie Rrp1 z jedno- i dwuniciowym DNA (Ryc. 34). Pewne różnice w sile wiązania do dwóch rodzajów DNA obserwowane w teście migracji kwasu nukleinowego w polu elektrycznym (EMSA) zainspirowały Doktoranta do dokładniejszego zbadania tego zjawiska za pomocą pomiaru anizotropii. Jednakże otrzymane wyniki nie pozwoliły na jednoznaczną ocenę różnic w sile wiązania Rrp1 z DNA.

Aby udokumentować bezpośrednio oddziaływanie pomiędzy białkami Rrp1 i Rad51 przeprowadzono immunoprecypitację z użyciem oczyszczonych białek, która to potwierdziła wyniki *in vivo* (Ryc. 38). Dalsza charakterystyka rejonów oddziaływania przy użyciu 2-hybrydowego systemu drożdżowego pozwoliła jedynie na wykazanie, że C-końcowa część Rrp1 oddziałuje z C-końcowym fragmentem Rad51 (Ryc. 39). Czy wiadomo z jakim rejonem Rad51 oddziałują takie białka jak Rdh54, Rad54 czy Uls1?

Jak już wspomniano, obecność Rad51 na jednoniciowym DNA jest promowana i kontrolowana przez wiele białek pełniących funkcje mediatorów i stabilizatorów. Wykazano wcześniej, że Rad51 przyłącza się również do dwuniciowego DNA, jednakże nadmierne wiązanie może być przyczyną zaburzeń w wydajności HR. Usuwanie Rad51 z dwuniciowego DNA w skutek działania translokaz tj. Rad54 przeciwdziała wielu niepożądanym reakcjom. W dalszych etapach pracy Doktorant sprawdził udział Rrp1 w funkcjonowaniu Rad51 w obecności jedno- i dwuniciowego DNA. Najpierw zbadał czy Rrp1 wpływa na powstawanie i funkcjonowanie nukleofilamentu Rad51 utworzonego na jednoniciowym DNA. Otrzymany wynik był negatywny (Ryc 40). Dodanie białka Rrp1 nie powoduje zmian w migracji kompleksów Rad51 z jednoniciowym DNA, nie wpływa na stabilizację czy dekompozycję nukleofilamentu (Ryc. 41). Ponieważ w reakcjach stabilizacji czy destabilizacji Rad51 na DNA mogą brać inne jeszcze białka, dodano do reakcji kompleksy Swi5/Sfr1 i RPA. Jednak jednoczesne dodanie Rrp1 nie zwiększało zarówno akumulacji jak i wiązania Rad51 do pojedynczej nici DNA (Ryc. 43, 44). Badania *in vivo* wskazywały, że nadprodukcja Rrp1 obniża ilość obserwowanych włókien Rad51, dlatego też postanowiono sprawdzić w reakcji *in vitro* czy Rrp1 może usuwać Rad51 z dwuniciowego DNA. Otrzymano pozytywny wynik zarówno w teście EMSA (Ryc. 45) jak i w wyniku pomiarów anizotropii fluorescencji (Ryc. 46, 47), wykazując ważną rolę białka Rrp1 w modulowaniu aktywności Rad51 związanego z dwuniciowym DNA. Chciałabym zapytać czy można jednoznacznie wykluczyć, że powyżej opisany wynik nie jest spowodowany konkurencją pomiędzy Rrp1 i Rad51 o wiązanie do dwuniciowego DNA? Rozumiem, że doktorant nie dysponuje oczyszczonym białkiem Rrp1 ze zmienioną domeną translokazy.

W reakcji wymiany nici w procesie rekombinacji zaangażowane są inne białka tj. kompleks Swi5/Sfr1, czy RPA. Następną część doświadczeń dotyczyła zbadania zaangażowania białka Rrp1 w tym procesie. Wykazano zauważalną stymulację przez Rrp1 reakcji wymiany nici ale jedynie w przypadku braku kompleksu Swi5/Sfr1 w reakcji. Przy wyższych stężeniach białka Rrp1 zauważono hamowanie reakcji, które prawdopodobnie było wynikiem konkurencji Rrp1 z Rad51 o wiązanie się z DNA (Ryc. 49). Następnie przeanalizowano w bardzo elegancki sposób wieloetapową reakcję wymiany nici DNA prowadzoną przez Rad51. Sprawdzono wpływ Rrp1 na intensywność parowania nici DNA. Niestety, wyniki były trudne do interpretacji. Uzyskanie pewnej stymulacji łączenia nici przez Rrp1 w nieobecności kompleksu Swi5/Sfr1 jedynie w początkowej fazie pomiaru można uznać za wynik obiecujący (Ryc.51), ale jak zauważa Doktorant wymaga on dalszych badań. Podobne trudności wystąpiły z interpretacją udziału Rrp1 w reakcji Rad51–zależnej stymulacji rozłączania nici w trakcie ich wymiany. Doktorant w swojej pracy podejmuje wstępną próbę analizy trudności pojawiających się podczas przeprowadzenia takiego eksperymentu, co nasuwa pytanie: jakiego typu badania należałoby przeprowadzić aby otrzymać bardziej jednoznaczne wyniki?

Bardzo ważnym wynikiem wskazującym na potencjalną rolę Rrp1 w procesie ubikwitynacji jest potwierdzenie, że występująca w tym białku domena RING jest związana z aktywnością ligazy ubikwitynowej (Ryc 54). W recenzowanej pracy wykazano, że Rrp1 typu dzikiego powoduje ubikwitynację Rad51, natomiast zmieniona forma w domenie RING nie wykazuje takich właściwości (Ryc. 55-57).

Następnie zbadano czy wydajność ubikwitynacji Rad51 może zależeć od obecności Rad51 na jedno- lub dwuniciowym DNA. W tej reakcji również dodawano czynniki stabilizujące Rad51 - Swi5/Sfr1 lub destabilizujący Rad51 kompleks - RPA. Wykazano, że obecność zarówno jedno- jak i dwuniciowego DNA obniża wydajność ubikwitynacji Rad51, co sugeruje, że procesowi ubikwitynacji przez Rrp1 podlega niezwiązane białko Rad51 (Ryc.56). Co ciekawe, analiza wyników z tego doświadczenia po detekcji z użyciem przeciwciał anti-ubikwityna wykazała pojawienie się prążków sugerujących ubikwitynację RPA w obecności Rrp1. Jakie dalsze doświadczenia są lub mogą być zaplanowane by sprawdzić czy rzeczywiście Rrp1 może ubikwitynować RPA? –Takie badania są szczególnie istotne w świetle wcześniejszych prac wykazujących ubikwitynację RPA bez degradacji proteasomalnej np. w przypadku zatrzymania widełek replikacyjnych. Co więcej, wykazano np., że ligaza E3 RFWD3 czy ligaza E3 PRP19 biorą udział w ubikwitynacji RPA. Stwierdzono, że zarówno RPA, jak i rekombinaza RAD51 bezpośrednio oddziałują z RFWD3 i ulegają ubikwitynacji w odpowiedzi na mitomycynę C. Co interesujące, wykazano, że w warunkach *in vitro* ubikwitynacja RPA oraz RAD51 zmniejsza ich powinowactwo do ssDNA (Inano, S.i wsp. *Mol. Cell* 2017). Chciałabym poznać opinię Doktoranta, czy gdyby przeprowadzono reakcje ze składnikami potrebnymi do ubikwitynacji, to czy w obecności Rrp1 wiązanie białka Rad51 do ssDNA lub jego usuwanie z ssDNA mogłoby ulec zmianie?

Można by też sprawdzić zależność ubikwitynacji Rad51 od obecności DNA w reakcji ze zmutowanym Rrp1 w domenie RING czy z zburzonym oddziaływaniem z DNA (zmniejszonym - Rad51-K191A lub zwiększonym Rad51-I345T). Myślę, że ten wątek jest nadzwyczaj interesujący i wart dalszych analiz. Chętnie zapoznam się opinią Doktoranta na ten temat.

Muszę przyznać, że rozdział WYNIKI jest napisany w bardzo przejrzysty sposób. Tytuły podrozdziałów opisujące otrzymany wynik i umieszczone na końcu podrozdziału wnioski znacznie ułatwiają czytanie. Podsumowując, otrzymane wyniki są bardzo interesujące, mają znaczenie dla poznania ważnych, uniwersalnych w świecie eukariontów mechanizmów warunkujących wierność reperacji i powielania materiału genetycznego, otwierają „drzwi” do dalszych badań. W przeważającej większości doświadczenia przedstawione w tej pracy zostały opublikowane w dwóch czasopismach – *Journal of Cell Science* w 2020 roku i w *Nucleic Acids Research* w 2021 roku. Zwłaszcza to ostatnie pismo o współczynniku cytowań 16,97 jest celem marzeń wielu naukowców i sam fakt publikacji jest najwyższą rękojmą jakości badań. Doktorant jest w tej pracy pierwszym autorem.

Model opisany w Dyskusji jest interesujący i przekonujący. Świadczy o znakomitej orientacji Doktoranta w literaturze naukowej, w badanej tematyce i o umiejętności interpretacji danych w świetle swoich i innych, znanych wyników. Doktorant nie tylko analizuje otrzymane wyniki, ale również rozpatruje ewentualne badania ważne do przeprowadzenia w przyszłości.

Chciałabym poznać opinię Doktoranta na temat opisanej w literaturze, nadprodukcji Rad51 wykrytej w komórkach nowotworowych. Jeśli nadprodukcja Rad51 jest toksyczna dla komórek to jakie mogą być mechanizmy związane z nadprodukcją Rad51 w komórkach nowotworowych?

Interesujące mogłyby być również badania udziału Rrp1 w kontroli funkcjonowania Rad51 w szczepach niosących mutacje powodujące stres replikacyjny. Mam na myśli np. mutacje powodujące nieprawidłowe funkcjonowanie replisomu, zwiększające częstość rekombinacji.

W części PODSUMOWANIE Doktorant podaje, że wyszczególnia wnioski na podstawie otrzymanych wyników, a w mojej ocenie wiele z tzw. wniosków to po prostu wyniki.

Cytowane pozycje literaturowe są starannie dobrane i odnoszą się do najważniejszych i najnowszych badań.


Z obowiązku recenzenta mogę wytknąć pewne, bardzo rzadkie przypadki „slangu laboratoryjnego” tj. ekspresja białka zamiast genu, dzikie białko zamiast białko typu dzikiego czy mało naukowe określenie – „identyczny efekt”. Są to mało istotne błędy pojawiające się w większości prac.

Podsumowując, praca ta podobnie jak i wcześniejsze prace z grupy Pani dr hab. Doroty Dziadkowiec jest napisana z wielką starannością. Rozprawa Pana Jakuba Muraszko przedstawia uważnie zaplanowane i wykonane doświadczenia, staranne zastosowanie wielorakiej metodologii, interesującą i roważną interpretację ciekawych wyników, które mają bardzo istotne znaczenie dla badań mechanizmów kontrolujących stabilność genetyczną a zwłaszcza poznania mechanizmu homologicznej rekombinacji.

W mojej opinii recenzowana rozprawa spełnia warunki określone dla kandydatów do stopnia naukowego doktora określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku, Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668).

Gratuluje Doktorantowi oraz Promotorowi interesujących wyników i zwracam się z uprzejmą prośbą do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o przyjęcie mojej pozytywnej recenzji i dopuszczenie Pana Jakuba Muraszko do dalszych etapów związanych z postępowaniem doktorskim.

Z uwagi na wysoki poziom naukowy i wagę prezentowanych w rozprawie badań wnioskuję o nagrodzenie rozprawy stosownym wyróżnieniem.


Iwona J. Fijałkowska