

Jakub Muraszko

„Właściwości biochemiczne Rrp1 istotne dla utrzymania stabilności genomu
Schizosaccharomyces pombe.”

Wykonana w Zakładzie Biotransformacji, Wydział Biotechnologii, U.Wr.

Promotor: dr hab. Dorota Dziadkowiec

Streszczenie

Proces homologicznej rekombinacji jest złożonym i niezwykle istotnym mechanizmem zapewniającym stabilność genomu. Badania nad jego przebiegiem pozwalają na zrozumienie replikacji, wymiany informacji genetycznej, czy naprawy DNA. Jednym z czynników, zaangażowanych w proces homologicznej rekombinacji u organizmu modelowego, jakim są drożdże *Schizosaccharomyces pombe*, jest kompleks białek Rrp1 i Rrp2. Dotychczasowe badania potwierdziły jego istotny wpływ na zachowanie stabilności genetycznej komórek *S. pombe*.

W niniejszej pracy przeprowadzono dokładną analizę interakcji Rrp1 z rekombinazą Rad51, która jest głównym enzymem biorącym udział w homologicznej rekombinacji. W pierwszej części pracy pokazano zdolność białka Rrp1 do regulacji Rad51 w komórkach *S. pombe*. Rrp1 ratuje toksyczny dla szczepu efekt nadprodukcji Rad51 i wpływa na jego lokalizację. Rrp1 lokalizuje w tych samych rejonach co Rad51 i tworzy z nim wspólny kompleks. Istotna dla tych procesów okazała się być aktywność translokazowa i w mniejszym stopniu ligazy ubikwitynowej Rrp1. Ponadto, oddziaływanie Rrp1 z RPA, białkiem wiążącym jednoniciowe DNA, sugeruje regulację Rad51 w obrębie widełek replikacyjnych.

W drugiej części pracy, pokazano szereg właściwości biochemicznych Rrp1 *in vitro*. Z powodzeniem przeprowadzono optymalizację procedury oczyszczania rekombinowanego białka Rrp1 w systemie bakteryjnym. Wykazano jego zdolność do DNA-zależnej hydrolizy ATP a także wiązania się do jedno- i dwuniciowej cząsteczki DNA. Pokazano bezpośrednio oddziaływanie Rrp1 z Rad51 za pomocą immunoprecypitacji *in vitro* i dodatkowo zidentyfikowano odpowiedzialny za to region. Przeanalizowano wpływ Rrp1 na tworzenie się kompleksów Rad51-DNA i wykazano zdolność Rrp1 do usuwania rekombinazy z podwójnej nici DNA. Rrp1 ma wpływ na przeprowadzanie przez Rad51 zrekonstruowanej w systemie *in vitro* reakcji wymiany nici. Ponadto Rrp1 posiada aktywność ligazy ubikwitynowej i jest w stanie ubikwitynować Rad51 w procesie *in vitro*, zależnym od Uba1 i Ubc4.

Dzięki danym zebranych zarówno w systemie *in vivo* i *in vitro* możliwe było zaproponowanie modelu interakcji Rrp1 z rekombinazą Rad51.