

Streszczenie

Dokładne skopiowanie całości materiału genetycznego oraz jego równocenna segregacja podczas podziału komórkowego to dwa kluczowe procesy dla przeżycia komórek potomnych. Zaburzenia tych procesów mogą prowadzić do niestabilności genomu, nowotworów lub wad rozwojowych u ludzi. Białko Irc5 z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* to zależna od ATP translokaza DNA o słabo poznanej funkcji w komórce, należąca do konserwatywnej rodziny białek SNF2. W wyniku hydrolizy ATP, translokazy DNA zdolne są do przemieszczania się po dwuniciowym DNA, w wyniku czego powstaje napięcie torsyjne w DNA, umożliwiając w ten sposób przebudowę chromatyny na wielu poziomach, w tym mogą wiązać inne białka do DNA lub je usuwać z DNA. Translokazy DNA pełnią w komórce wiele podstawowych funkcji związanych z metabolizmem DNA, takich jak transkrypcja, replikacja, rekombinacja czy naprawa DNA i są niezbędne do utrzymania stabilności genomu. W niniejszej pracy wykazano, że białko Irc5 jest niezbędne podczas stresu replikacyjnego wywołanego przez metanosulfonian metylu (MMS), który poprzez alkilację DNA blokuje ruch widełek replikacyjnych. Dokończenie replikacji alkilowanego DNA wymaga aktywacji punktu kontrolnego fazy S cyklu komórkowego, co skutkuje stabilizacją widełek replikacyjnych oraz wydłużeniem fazy S; ponadto wymaga inicjacji mechanizmu tolerancji na uszkodzenia DNA, który umożliwia replikację ponad uszkodzeniem lub jego ominięcie, a także wypełnienie jednoniciowych przerw w DNA powstających na skutek inicjacji replikacji z nowego miejsca za uszkodzeniem DNA. Mutant pozbawiony genu *IRC5* charakteryzuje się zwiększoną wrażliwością na MMS, znacznym wydłużeniem syntezy DNA, akumulacją jednoniciowych przerw w DNA, przy czym wykazuje normalną aktywację punktu kontrolnego fazy S. Wyniki te wskazują na udział białka Irc5 w procesie tolerancji na uszkodzenia DNA, na który składają się dwa szlaki: synteza DNA ponad uszkodzeniem przy udziale specjalnego typu polimeraz oraz zależne od rekombinacji DNA przełączenie matrycy między chromatydami siostrzanymi. Analizy genetyczne mutantów wielokrotnych umiejscowiły gen *IRC5* na szlaku przełączania matrycy. Jednocześnie odkryto, że Irc5 bierze udział w ładowaniu kohezyn na chromosomy. Kohezyna jest to pierścieniowy kompleks białkowy, który spina chromatydy siostrzane i uniemożliwia ich przedwczesne rozdzielanie oraz nierówną segregację podczas mitozy. W mutancie delecyjnym *IRC5* częściej dochodziło do przedwczesnego rozdzielania chromatyd siostrzanych, co było spowodowane zaburzeniem procesu ładowania kohezyn na DNA przez kompleks Scc2-Scc4. Kohezyny ładowane są na DNA także w pobliżu zatrzymanych widełek replikacyjnych, co ułatwia przełączenie matrycy z jednej chromatydy na drugą i ominięcie uszkodzenia. W mutancie delecyjnym *IRC5* zaobserwowano znacznie

niższy poziom kohezyn w pobliżu zatrzymanych widełek replikacyjnych oraz zmniejszony poziom rekombinacyjnych struktur, które powstają podczas przełączania matrycy. W związku z tym zaproponowano, że białko Irc5 ułatwia dokończenie replikacji alkilowanego DNA dzięki promowaniu ładowania kohezyn na DNA, co z kolei ułatwia zajście procesu przełączania matrycy, a w konsekwencji ominięcie uszkodzenia i wypełnienie jednoniciowych przerw w DNA. W związku z tym, że funkcje białka Irc5, zarówno w kohezji chromatyd siostrzanych jak i w tolerancji na uszkodzenia DNA na szlaku przełączania matrycy, zależą od jego ATP-zależnej aktywności translokazowej wydaje się zasadna hipoteza, że Irc5 promuje oba procesy przez przebudowę struktury chromatyny w taki sposób, aby stworzyć optymalne warunki dla ładowania kohezyn na DNA w odpowiednich miejscach genomu.

21.01.2020r.

Tomasa Rafanolo

Abstract

Accurate copying of genetic material and its equal segregation during cell division are two key processes for the survival of daughter cells. Perturbations of these processes can lead to genomic instability, cancers or developmental disorders in humans. The Irc5 protein from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is an ATP-dependent DNA translocase with poorly understood function in the cell belonging to the conservative family of SNF2 proteins. As a result of ATP hydrolysis, DNA translocases are able to move on double-stranded DNA, resulting in a torsion tension in the DNA, thus enabling the remodeling of chromatin at many levels, including the recruitment or removal of other proteins from DNA. Therefore, DNA translocases perform several basic functions in the cell related to DNA metabolism, such as transcription, replication, recombination and DNA repair, and are necessary to maintain genome stability. In this study, it has been shown that the Irc5 protein is important during replication stress caused by methylmethane sulfonate (MMS), which blocks the movement of replication forks by means of DNA alkylation. Completing the replication of alkylated DNA requires activation of the S phase checkpoint, which results in stabilization of the replication forks and extension of the S phase, and the initiation of a mechanism of DNA damage tolerance that allows translesion synthesis, DNA damage bypass and filling of single-stranded DNA gaps that result from repriming of DNA synthesis downstream of the bulky lesion. The mutant lacking the *IRC5* gene is characterized by increased sensitivity to MMS, significant extension of S phase, accumulation of single-stranded DNA gaps, but exhibits normal activation of S phase checkpoint. These results indicate the involvement of the Irc5 protein in the process of DNA damage tolerance, which consists of two pathways: translesion synthesis using a special type of polymerases and template switching dependent on DNA recombination between sister chromatids. Genetic analyzes of multiple mutants mapped the *IRC5* gene on the template switching pathway. At the same time, it has been discovered that Irc5 is involved in the loading of cohesins on DNA. Cohesin is a ring protein complex that encircles sister chromatids and prevents their premature separation and unequal segregation during mitosis. In the *IRC5* deletion mutant, the premature separation of sister chromatids was more frequent, which was caused by perturbation of the cohesin loading process by the Scc2-Scc4 complex. Cohesins are also loaded on DNA near stalled replication forks, which makes it easy to switch template from one chromatid to the other. In the *IRC5* deletion mutant, a significantly lower level of cohesins near stalled replication forks and reduced levels of recombinant structures that arise during template switching have been observed. Therefore, it has been proposed that

the Irc5 protein facilitates the completion of replication of the alkylated DNA by promoting the loading of cohesins on DNA near blocked replication forks, which facilitates template switching, damage bypass and filling of single-stranded DNA gaps. Due to the fact that the functions of Irc5 both in sister chromatid cohesion and in the template switching pathway of DNA damage tolerance depend on its ATP-dependent translocase activity, it seems reasonable to hypothesize that Irc5 promotes both processes by remodeling the chromatin structure in such a way to create optimal conditions for loading cohesins onto DNA in relevant sites of genome.

21.01.2020r.

Tomáš Křivánek