

Charakterystyka funkcjonalna ludzkiego białka BEND3

W DNA każdej żywej komórki ludzkiej dochodzi codziennie do powstawania tysięcy uszkodzeń. Spowodowane są one działaniem czynników egzogennych np. ekspozycją na promieniowanie ultrafioletowe, mogą być efektem szkodliwego wpływu produktów metabolizmu komórki np. reaktywnych form tlenu lub powstają spontanicznie np. w przebiegu replikacji. Wśród najczęściej występujących uszkodzeń DNA wyróżnia się modyfikacje zasad azotowych i jednoniciowe pęknięcia DNA. Do rzadziej występujących, ale najbardziej szkodliwych dla komórek należą dwuniciowe pęknięcia DNA. Nieprawidłowy przebieg naprawy tych zmian lub brak aktywacji odpowiednich mechanizmów może mieć efekt letalny, prowadzić do przedwczesnego starzenia lub wzrostu ryzyka zachorowania np. na choroby nowotworowe. Aby przeciwdziałać szkodliwym skutkom uszkodzeń DNA oraz utrzymywać integralność i stabilność genomu komórki dysponują mechanizmem zwanym odpowiedzią komórki na uszkodzenia DNA. W zależności od typu i struktury uszkodzenia możliwe jest uruchomienie jednego z sześciu głównych mechanizmów naprawy DNA. Wszystkie te procesy wymagają udziału wielu kompleksów białkowych o różnych funkcjach, wśród których bardzo ważną rolę odgrywają kompleksy remodelujące chromatynę.

BEND3 (BEN domain-containing protein 3) jest białkiem jądrowym, które zaangażowane jest w proces regulacji transkrypcji genów i uczestniczy w organizacji chromatyny. Jego rola w komórkach ludzkich pozostaje wciąż słabo poznana. Białko to oddziałuje z podjednostkami kompleksów remodelujących chromatynę NoRC i NuRD. Oddziaływanie BEND3 z podjednostką kompleksu NoRC - białkiem Tip5 umożliwia jego stabilizację i przyczynia się do regulacji ekspresji genów kodujących rRNA. Ponadto interakcja BEND3 z podjednostkami kompleksów NoRC i NuRD związana jest z mechanizmami organizacji heterochromatyny. W ostatnim czasie zidentyfikowano również oddziaływanie BEND3 w komórkach mitotycznych, z białkiem PICH zaangażowanym w rozplatanie struktur mostków anafazowych. Jednak rola tego kompleksu pozostaje nieznana.

Głównym celem prezentowanej rozprawy doktorskiej była charakterystyka białka BEND3 i identyfikacja funkcji tego białka w komórkach ludzkich. Analiza interaktomu otrzymanego w wyniku oczyszczenia kompleksów tworzonych przez BEND3 w komórkach ludzkich pozwoliła na identyfikację licznych białek oddziałujących z BEND3 zaangażowanych w różne procesy komórkowe m. in. regulację transkrypcji, remodelowanie chromatyny i naprawę DNA. Przeprowadzone analizy potwierdziły oddziaływanie białka BEND3 z podjednostkami kompleksu NuRD i NoRC, świadczące o udziale tego białka w mechanizmach remodelowania chromatyny. Wykazano również, że białko BEND3 oddziałuje z podjednostką kompleksów metylotransferaz histonowych H3K4 - białkiem hDPY30. Przeprowadzona charakterystyka strukturalna kompleksu BEND3-hDPY30 wykazała, że w oddziaływaniu tym udział bierze koniec aminowy BEND3 i motyw Dpy-30 białka hDPY30. Przeprowadzone badania wykazały

również, że białko BEND3 ma zdolność tworzenia homodimerów, do tworzenia których konieczna jest sekwencja zawierająca domeny BEN.

W interaktomie białka BEND3 zidentyfikowano dużą grupę białek uczestniczących w przebiegu mechanizmów naprawy DNA, w tym szlaków naprawy dwuniciowych pęknięć DNA. Przeprowadzona analiza oddziaływań potwierdziła interakcję BEND3 z głównymi białkami szlaku NHEJ naprawy dwuniciowych uszkodzeń DNA jak Ku70, Ku80 i p53BP1. Ponadto wykazano bezpośrednie oddziaływanie BEND3-Ku70, do którego tworzenia konieczna jest obecność domeny BEN na końcu karboksylowym białka BEND3. Udział BEND3 w mechanizmach naprawy DNA potwierdzono w wyniku obserwacji akumulacji tego białka na obszarach uszkodzeń DNA indukowanych laserem. Wyznaczona kinetyka rekrutacji BEND3 do miejsc indukowanych uszkodzeń DNA jest podobna do kinetyki charakterystycznej dla białka Ku70, jednak obecność Ku70 w komórce nie jest istotna dla prawidłowego przebiegu tego procesu. Przeprowadzona analiza wykazała, że rekrutacja BEND3 przebiega w sposób zależny od aktywności enzymatycznej PARP1, jednak nie ma na nią wpływu obecność argininy w pozycji 74, wyznaczonej *in silico* jako potencjalne miejsce PARylacji. Przebieg procesu akumulacji białka BEND3 w miejscach uszkodzeń DNA indukowanych laserem jest natomiast zależny od SUMOilacji tego białka w pozycji K20. Otrzymane wyniki dostarczają także dowodów na udział BEND3 w naprawie dwuniciowych uszkodzeń DNA. Przeprowadzone analizy wykazały, że wyciszenie ekspresji genu kodującego BEND3 obniża efektywność naprawy uszkodzeń DNA indukowanych bleomycyną.

Podsumowując, prezentowane wyniki świadczą o udziale białka BEND3 w przebiegu wielu procesów jądrowych. Rola tego białka nie ogranicza się do regulacji ekspresji genów i organizacji heterochromatyny okołocentromerowej. Uzyskane wyniki wskazują na nieznaną dotąd funkcję regulatora transkrypcji BEND3 w naprawie DNA. Jednak określenie molekularnego mechanizmu regulacji szlaków naprawy DNA przez BEND3 wymaga przeprowadzenia dalszych szczegółowych badań.

Functional characterization of the human BEND3 protein

The genomes of all organisms are exposed to damage that occurs due to the action of various exogenous factors like ultraviolet radiation, harmful impact of cellular metabolism by-products such as reactive oxygen species or may appear spontaneously for example during replication. The most common DNA lesions are base modifications and single-strand breaks. Among the most deleterious DNA damages are double-strand breaks (DSBs). Functional consequences of unrepaired or repaired incorrectly lesions are embryonic lethality, premature senescence and increased susceptibility to diseases such as cancer. Cells developed mechanisms known as DNA damage response to counteract adverse DNA damage effects and to help maintain stability and integrity of their genomes. Depending on the nature or structure of DNA lesions at least six pathways are available to respond to damage. All of these mechanisms require the participation of many protein complexes with diverse functions, among which chromatin remodelling complexes play a very important role.

The BEN domain-containing protein 3 (BEND3) is a nuclear protein, classified as a transcriptional repressor involved in chromatin remodelling, but its role in human cells is not well known yet. It was found that BEND3 interacts with the NoRC and NuRD complexes. BEND3 interacts, stabilizes and prevents degradation of Tip5, a subunit of chromatin remodelling complex NoRC and thus leads to the transcription regulation of rRNA genes. Moreover, with high probability BEND3 together with NoRC and NuRD complexes are involved in heterochromatin organization. Recently, BEND3 has been identified in complex with PICH protein in mitotic cells. PICH is a protein that colocalizes with ultrafine anaphase DNA bridges and is necessary for its resolution. However, the role of this complex remains unknown.

The main goal of the presented doctoral thesis was to characterize the BEND3 protein and to determine the role of this protein in human cells. Analysis of the interactome obtained as a result of the purification of complexes formed by BEND3 in human cells has allowed the identification of numerous proteins interacting with BEND3 involved in various cellular processes, among others regulation of transcription, chromatin remodelling and DNA damage repair. Conducted experiments confirmed the interaction of the BEND3 protein with the subunits of the NuRD and NoRC complexes, which confirmed the participation of this protein in the mechanisms of chromatin remodelling. It was also shown that the BEND3 protein interacts with the subunit of H3K4 histone methyltransferase complexes - the hDPY30 protein. The structural characterization of the BEND3-hDPY30 complex showed that this interaction involves the N-terminal fragment of the BEND3 protein and the Dpy-30 motif of the hDPY30 protein. The conducted research also showed that the BEND3 protein has the ability to form homodimers, which require the sequence containing the BEN domains.

A large group of proteins participating in the DNA repair mechanisms including DNA double-strand break repair pathways were identified in the BEND3 protein interactome. Further analysis confirmed the interaction of BEND3 with the main NHEJ pathway proteins involved in the repair of DNA double-strand breaks such as Ku70, Ku80 and p53BP1. Moreover, the direct interaction between BEND3 and Ku70 has been demonstrated, which requires the presence of the BEN4 domain at the carboxyl end of the BEND3 protein. The microscopic analysis of BEND3 recruitment to the laser-induced DNA damage sites demonstrated that BEND3 is rapidly accumulated at laser induced damage site. The kinetics of BEND3 recruitment to the sites of DNA damage is similar to the kinetics of Ku70 recruitment. However, in spite of similar kinetics, Ku70 is not responsible for BEND3 recruitment to the laser-irradiated sites. The analysis of BEND3 recruitment to DNA damage sites in the presence of PARP1 inhibitor demonstrated that its accumulation is dependent on PARP1 enzymatic activity. However, the *in silico* predicted PARylation site (R74) does not contribute to BEND3 accumulation at the sites of DNA damage, but its recruitment is slightly modulated by SUMOylation. Finally, the results obtained also provide evidence for the participation of BEND3 in the repair of DNA double-strand breaks. The analyses performed showed that BEND3 gene silencing reduces the repair efficiency of bleomycin-induced DNA damage.

In conclusion, all presented results have provided new insight into BEND3 roles in diverse processes in human cells. BEND3 is not only involved in gene expression regulation and in the organization of heterochromatin, but also participates in DNA-damage repair mechanisms. However, determination of the molecular mechanisms of DNA-damage response regulation by the BEND3 protein requires further detailed studies.