

CHARLES UNIVERSITY

Faculty of Science

Cell and Developmental Biology

Summary of the Ph.D. thesis



Patrick von Morgen, MSc

Regulation of the DNA damage response by R2TP mediated MRN complex assembly and control of 53BP1 localisation.

Regulace buněčné odpovědi na poškozenou DNA pomocí skládání komplexu MRN šaperonovým komplexem R2TP a pomocí kontroly buněčné lokalizace proteinu 53BP1.

PhD thesis

Supervisor: Zuzana Hořejší, PhD.

Co-supervisor: Libor Macůrek, MD PhD.

Laboratory of Cancer Cell Biology; Institute of Molecular Genetics of the ASCR

Prague 2017

Abstract

DNA double strand breaks are the most dangerous type of DNA damage. The MRN complex and 53BP1 have essential functions in the repair of DNA double strand breaks and are therefore important for maintaining genomic stability and preventing cancer. DNA double strand breaks are repaired by two main mechanisms - homologous recombination and non-homologous end joining. The MRN complex senses DNA double strand breaks and activates a cascade of posttranslational modifications that activates and recruits other effector proteins. In addition MRN mediated resection is important for removing adducts in non-homologous end joining and creating single stranded DNA required for homologous recombination. 53BP1 is recruited to DNA double strand breaks by site specific ubiquitinations and inhibits DNA resection, thereby promoting non-homologous end joining at the expense of homologous recombination. In this thesis we show that MRE11 binds to the R2TP chaperone complex through a CK2 mediated phosphorylation. Knockdown of R2TP or mutating the MRE11 binding site leads to decreased MRE11 levels and impaired DNA repair. Similar phenotype has been observed in cells from patients with ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD), containing MRE11 deletion mutation which is missing the R2TP complex binding site. Based on R2TP complex function as a molecular chaperone, we conclude, that R2TP complex is important for MRN complex assembly/quality control. Moreover, we explored the processes important for regulating localisation of DNA repair protein 53BP1 to the nucleus and DNA damage site. We investigated PLK1 and CDK1 mediated phosphorylations in 53BP1 ubiquitin binding domain and discovered that they inhibit 53BP1 recruitment to the DNA damage site in mitosis. Finally we discovered the sequence of 53BP1 localisation signal and explored regulatory mechanisms of 53BP1 nuclear localisation by post translational modifications. In conclusion, we deepened our understanding of MRN complex assembly and pathophysiology of a specific MRE11 mutation leading to ATLD. In addition we found new ways of regulation of 53BP1 localization and function.

Abstract (Czech)

Dvouvláknové zlomy jsou nejnebezpečnějším typem poškození DNA. Proteinový komplex MRN a protein 53BP1 hrají důležitou roli při opravě dvouvláknových zlomů DNA a jsou proto nezbytné pro udržení stability DNA a prevenci rakoviny. Dvouvláknové zlomy mohou být opraveny dvěma hlavními způsoby - homologní rekombinací a nehomologním spojením konců DNA. MRN detekuje dvouvláknové zlomy DNA a aktivuje signální kaskády vedoucí k opravě DNA nebo buněčné apoptoze. Zároveň komplex MRN pomáhá během nehomologního spojení konců DNA začistit konce DNA a vytvořit jednořetězcové úseky DNA potřebné pro homologní rekombinaci. 53BP1 inhibuje resekcí DNA, čímž podporuje nehomologní spojení konců na úkor homologní rekombinace. V této práci ukazujeme, že MRE11 se váže na šaperonový komplex R2TP prostřednictvím místa fosforylovaného CK2. Snížení hladiny R2TP komplexu nebo zmutování vazebného místa pro MRE11 vede k destabilizaci MRE11 a k narušení opravy DNA. Podobný fenotyp byl pozorován v buňkách pacientů s dědičným syndromem ataxie-telangiectasie (ATLD), které obsahují zkrácený protein MRE11, v němž chybí vazebné místo pro komplex R2TP. Vzhledem k funkci R2TP jako molekulárního šaperonu předpokládáme, že R2TP je důležitý pro sestavování nebo kontrolu kvality komplexu MRN. Dále jsme prozkoumali procesy důležité pro regulaci jaderné lokalizace 53BP1 a jeho vazbě na poškozenou DNA. Ukázali jsme, že fosforylace 53BP1 zprostředkované kinázami PLK1 a CDK1 zabraňují vazbě 53BP1 k poškozené DNA během mitózy. V poslední části této práce jsme identifikovali umístění jaderného lokalizačního signálu v 53BP1 a vysvětlili jak je jaderná lokalizace 53BP1 regulovaná posttranslačními modifikacemi. Tato práce vedla k prohloubení našich vědomostí o sestavování komplexu MRN a patofyziologii specifické mutace MRE11 vedoucí k ATLD syndromu. Zároveň jsme objevili nové způsoby regulace jaderné lokalizace a funkce 53BP1.

Introduction

The DNA damage response is a set of pathways that become activated after the occurrence of DNA damage. The main function of these pathways is to detect the DNA damage, induce DNA damage cell cycle checkpoint and repair the damage, thereby protecting genomic stability and preventing development of cancer (1). DNA double strand breaks are the most dangerous type of DNA damage - when left unrepaired, a single DNA double strand break can lead to cell death or the loss of many genes simultaneously, while imperfect repair also leads to the loss of genetic information or chromosome fusions (2).

The repair of DNA double strand breaks occurs mainly through one of two distinct mechanisms; non homologous end joining (NHEJ) or homologous recombination. NHEJ is the dominant way of repairing DNA double strand breaks and usually leads to small deletions at the site of the break (3). For homologous recombination, the use of a template enables error-free repair of DNA double strand breaks but restricts this type of repair to the S and G2 phase of the cell cycle. MRN complex recognizes DNA double strand breaks and creates stretches of single stranded DNA. These resected short stretches of single stranded DNA are extended by long-range resection mediated by nucleases EXO1 and DNA2 (4, 5). Later the single-stranded DNA is coated with the recombinase RAD51, which catalyses strand exchange between the newly created single stranded DNA and the sister chromatid allowing template directed DNA synthesis (6). The newly formed intermediate can be resolved either by synthesis-dependent strand annealing or through a double holiday junction intermediate, the latter can in some cases result in a cross over where one side of the double strand break is exchanged with the sister chromatid (7, 8). In addition MRN complex-mediated resection is not only important for homologous recombination but also for removing adducts in non-homologous end joining, The MRN complex activates kinases from the phosphatidylinositol 3-kinase related kinase family (PIKKs) ATM, DNA-PK and ATR (9-11). PIKKs transduce the signal by phosphorylating hundreds of substrates, thereby orchestrating the recruitment of repair proteins, including 53BP1, and activation of the cell cycle checkpoint. Mutations in MRE11 lead to ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD), characterized by neurodegeneration and sensitivity to irradiation (see figure 1). ATLD1 patients with a truncating mutation in MRE11 (R633STOP) have low levels of the MRN complex for which the molecular mechanism is not understood (12-14).

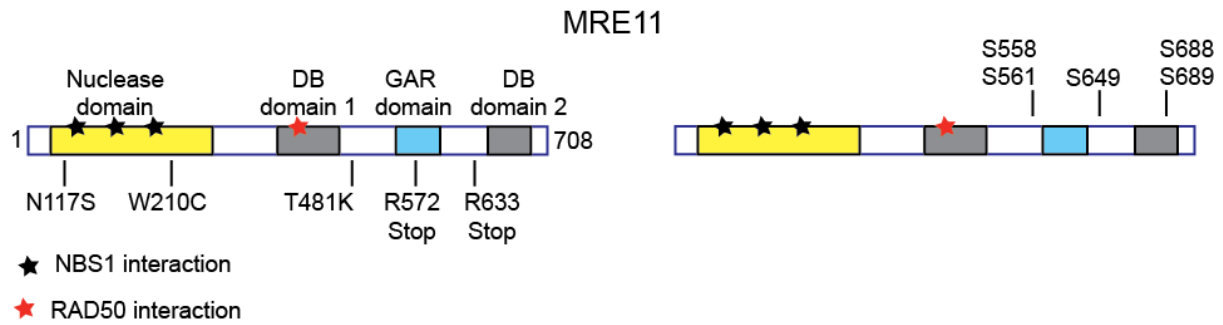


Figure 1. ATLD mutations in MRE11. The domain organization of MRE11 is depicted. The N-terminus contains the Nuclease Domain and is important for the interaction with NBS1. The middle and C-terminus contain two distinct DNA binding domains and a Glycine Arginine rich motif (GAR domain). ATLD mutations are depicted on the left and acidic regions that could function as PIH1D1 binding sites on the right. Notice that two of these binding sites are missing in the R633Stop mutation (ATLD1)

53BP1 is a large protein that acts as a molecular platform for the recruitment of other DNA damage response proteins to the sites of DNA damage. 53BP1 inhibits both the initiation and the extent of resection and is therefore important for the choice between NHEJ and homologous recombination and preventing over resection during homologous recombination (15-17). 53BP1 recruitment to DNA double strand breaks depends on its C-terminal region, which contains an oligomerization domain, a Tudor domain that binds methylated histone 4, a UDR motif which recognizes DNA-damage specific ubiquitination of histone 2AX and a putative nuclear localization signal. Interestingly, 53BP1 recruitment to the DNA damage is inhibited during mitosis while there is normal recruitment of more upstream DNA repair proteins such as MDC1.

Aims

The aim of this thesis was to increase our understating of the regulation of DNA damage response. In the main part of the thesis we investigated why MRN complex becomes unstable in ATLD1 patients. In addition we explored the processes that regulate localisation of DNA repair protein 53BP1 to the nucleus and to the site of the DNA damage.

Methods

Cell culture

Transfections

siRNA/DNA damaging treatments

Molecular cloning

Expression and purification of recombinant proteins

Flow cytometry analysis

Immunofluorescence and microscopic analysis

Western blotting

Proximity ligation assay

Immunoprecipitation

Pull downs

In vitro assays: kinase, phosphatase and acetylation assays

Results and discussion

We show that the stability and function of the MRN complex is regulated by the R2TP chaperone complex. The R2TP complex is important for assembly and/or quality control of large protein complexes and its absence leads to their instability (18). R2TP complex recognizes its substrate by a phospho-specific PIH-N domain, contained in R2TP complex subunit PIH1D1 (19). We uncovered that the R2TP complex binds two phosphorylated acidic motifs within the C-terminus of MRE11 via its PIH-N domain. The acidic motif missing in ATLD1 patients (see figure 1) containing serine 688 and 689 was found to be the most important for the observed interaction between MRE11 and PIH1D1, with an additional smaller contribution of the acidic site containing phosphorylated serine 558 and serine 561. We have identified CK2 as the kinase phosphorylating serine 688 and 689 and showed that long-term depletion of PIH1D1 decreases the stability of MRN complex components. Moreover, mutation of MRE11 serine 688/689 to alanine also led to decreased stability of MRE11. In accordance with the lower levels of MRN complex after PIH1D1 depletion, we observed defects in two processes regulated by MRN complex: repair of DNA double strand breaks and removal of TOPOII adducts after etoposide poisoning.

We conclude that the R2TP complex is important for MRN complex stability and function and that MRN complex instability in ATLD1 patients can be for the first time explained by reduced interaction of MRE11 with the R2TP complex.

Furthermore, we explored the regulation of localisation of DNA repair protein 53BP1 to the nucleus and DNA damage site. We discovered that 53BP1 binds to importin α and that aa1666-1686 of 53BP1 harbour a classical bipartite nuclear localization signal, which is solely sufficient for nuclear import. Since mass spectrometry screens reported several post-translational modifications of 53BP1 aa1666-1686, we explored potential regulatory mechanisms of the nuclear import of 53BP1. We discovered that serine 1678, which is reported to be phosphorylated in mitosis by mass spectrometry screens, is phosphorylated by cyclinB-CDK1 *in vitro*. We found that phospho-mimicking mutation of this site strongly decreases the interaction with the importins and leads to decreased nuclear localisation of 53BP1. Therefore, we propose that serine 1678 needs to be rapidly dephosphorylated at mitotic exit to allow efficient transport of 53BP1 to the nucleus. In addition, we tested the effect of acetylation of lysine 1667 by mutating this site and we found that even very mild alterations of this site severely decreases the nuclear localisation of 53BP1.

Finally we addressed the question why the recruitment of 53BP1 is repressed during mitosis. We found that phosphorylation of 53BP1 is increased in mitosis and the phosphorylation depends on PLK1 and CDK1 activity, kinases highly active during the mitosis. We showed that PLK1 phosphorylates 53BP1 *in vivo* on serine 1618 and that CDK1 can phosphorylate T1609 and S1678. S1618 and T1609 are located within the UDR domain of 53BP1, which is important for the binding to ubiquitinated histones. 53BP1 with threonine 1609 and serine 1678 substituted by the phospho-mimicking aspartic acid leads to decreased binding to ubiquitin and reduced 53BP1 recruitment to the sites of DNA damage in G1 cells. Similarly, inhibition of PLK1 and therefore reduction of serine 1618 phosphorylation in mitosis, increases the repair capability of mitotic cells although not completely. Restoration of 53BP1 localization in mitosis leads to hypersensitivity to irradiation in mitosis and genomic instability caused by telomere fusions (20, 21).

Conclusions

In this thesis we determined a CK2 mediated interaction between the MRN and R2TP complex and we showed that the R2TP complex is important for MRN complex stability and MRN-mediated repair. We determined the nuclear localization signal of 53BP1 and we identified specific posttranslational modifications that can regulate 53BP1 localisation. Furthermore, we found that CDK1 and PLK1 mediated phosphorylation of 53BP1 UDR domain inhibits the recruitment of 53BP1 to sites of DNA damage. This work therefore brought new insights into the function and regulation of the highly important DNA damage repair factors MRN complex and 53BP1.

Úvod

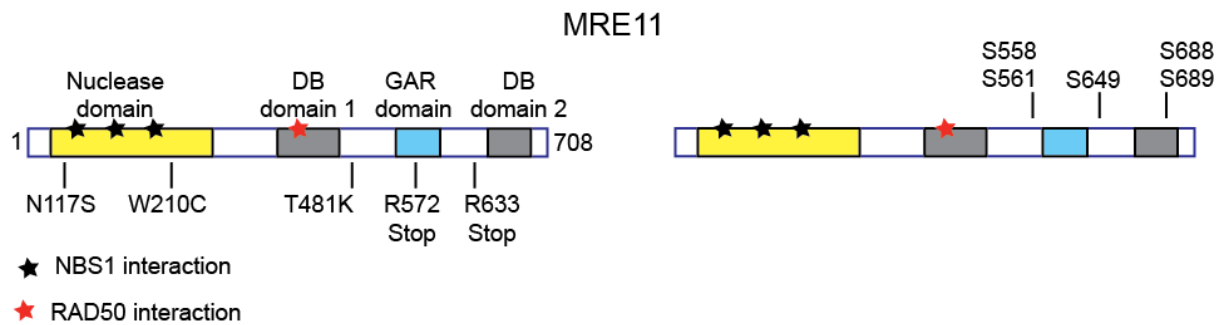
Poškození DNA aktivuje v buňkách soubor signálních drah, jejichž hlavním úkolem je odhalit poškozenou DNA, zastavit buněčný cyklus a opravit poškozenou DNA, a tudíž chránit stabilitu genomu a zabránit rozvoji rakoviny (1). Dvouvláknové zlomy DNA jsou nejnebezpečnějším typem poškození DNA – jediný neopravený dvouvláknový zlom může vést k buněčné smrti nebo k současné ztrátě mnoha genů, zatímco jeho nedokonalá oprava může vést ke ztrátě genetické informace nebo k fúzi chromozomů (2).

Dvouvláknové zlomy mohou být opraveny dvěma hlavními způsoby - homologní rekombinací a nehomologním spojením konců DNA. Nehomologní spojení konců DNA obvykle vede k malým delecím v místě zlomu (3), zatímco homologní rekombinace je bezchybná, protože k opravě využívá přítomnost sesterské chromatidy. Homologní rekombinace je tudíž omezená na S a G2 fázi buněčného cyklu, kdy je sesterská chromatida přítomná. Komplex MRN rozeznává dvouvláknové zlomy v DNA a vytváří krátké úseky jednovláknové DNA na obou koncích dvouvláknového zlomu. Ty jsou následně prodlouženy resekci zprostředkovanou nukleázami EXO1 a DNA2 (4, 5). Na jednovláknové úseky se později naváže rekombináza RAD51, která katalyzuje rekombinaci mezi nově vytvořenou jednovláknovou DNA a sesterskou chromatidou (6). Homologní rekombinace často vede k tvorbě Hollidayovy struktury mezi oběma sesterskými chromatidami, která je nutná enzymaticky rozvolnit (7, 8). Komplex MRN zároveň pomáhá začistit konce poškozené DNA během nehomologního spojení konců DNA.

Komplex MRN aktivuje kinázy ATR, ATM a DNA-PK (9-11), které fosforylují stovky substrátů, jež regulují vazbu opravných proteinů (jako například 53BP1) na poškozenou DNA a které zastaví buněčný cyklus. Pacienti s dědičným syndromem ataxie-telangiectasie (ATLD) mají mutovaný protein MRE11 (viz obrázek 1). Tento syndrom je provázený neurodegenerací, častějším výskytem rakoviny a zvýšenou citlivostí buněk pacientů na radioterapii. Pacienti s ATLD podtyp 1 (ATLD1) exprimují zkrácený MRE11 (R633STOP) a mají nízkou celkovou hladinu komplexu MRN. Příčina této nízké hladiny není známá (12-14).

53BP1 zprostředkuje vazbu dalších opravných proteinů do blízkosti poškozené DNA. 53BP1 inhibuje jak iniciaci, tak rozsah resekce konců DNA, a proto je jedním z proteinů určujících jestli bude dvouvláknový zlom opraven homologní rekombinací nebo nehomologním spojením konců DNA (15-17). Vazba 53BP1 do místa poškozené DNA závisí na jeho C-konci, který obsahuje oligomerizační doménu, doménu Tudor, která váže methylovaný histon 4, motiv UDR, který rozpoznává specifickou ubikvitinaci histonu 2AX a předpokládaný jaderný lokalizační signál. Je

zajímavé, že vazba 53BP1 na poškozenou DNA je inhibována během mitózy, zatímco ostatní proteiny, které umožňují vazbu 53BP1 na poškozenou DNA (například MDC1), se během mitózy na poškozenou DNA váží.



Obr. 1. ATLD mutace v MRE11. Znázorněno je uspořádání domén v MRE11. N-konec obsahuje nukleázovou doménu a je důležitý pro interakci s NBS1. Střední a C-koncová část MRE11 obsahuje dvě různé DNA vazebné domény a motiv bohatý na glycin a arginin (GAR doména). ATLD mutace jsou zobrazeny vlevo. Vpravo jsou zobrazeny kyselé oblasti, které by mohly fungovat jako vazebná místa pro PIH1D1. Dvě z těchto vazebných míst chybí v R633Stop mutaci (ATLD1)

Cíle

Cílem této práce bylo prohloubit naši znalost o regulaci procesů vedoucích k rozeznání a opravě poškozené DNA. V hlavní části této práce jsme zkoumali, proč je komplex MRN nestabilní v buňkách pacientů se syndromem ATLD1. Dále jsme prozkoumali jak je řízena lokalizace proteinu 53BP1 v jádře a jeho vazba do místa poškozené DNA.

Metody

Kultivace buněčných kultur

Transfekce

Regulace exprese genů pomocí siRNA

Ovlivnění signálních drah DNA poškození pomocí chemických látek či iradiace

Molekulární klonování

Expres a purifikace rekombinantních protein

Průtoková cytometrie

Imunofluorescence a mikroskopická analýza

Western blot

Proximity ligation assay

Imunoprecipitace

Pull down

In vitro esej: kinázový, fosfatázový a acetylační esej

Výsledky a diskuse

Ukázali jsme, že stabilita a funkce komplexu MRN je regulována šaperonovým komplexem R2TP. Komplex R2TP je důležitý pro sestavování nebo kontrolu kvality velkých proteinových komplexů a jeho absence vede k jejich nestabilitě (18). R2TP komplex rozpoznává svůj substrát skrze PIH-N doménu, která se váže na fosforylovaný substrát a která je součástí podjednotky R2TP komplexu PIH1D1 (19). Zjistili jsme, že R2TP komplex váže pomocí PIH-N domény dva fosforylované kyselé motivy umístěné v C-konci MRE11. Přítomnost motivu, který obsahuje fosforylovaný serin 688 a 689 a který chybí u pacientů s ATLD1 (viz obr. 1), je pro vazbu mezi MRE11 a PIH1D1 nejdůležitější. Druhý motiv, který obsahuje fosforylovaný serin 558 a 561, váže PIH1D1 se slabší afinitou. Naše experimenty prokázaly, že seriny 688 a 689 jsou fosforylované CK2 a že dlouhodobé snížení hladiny PIH1D1 snižuje stabilitu podjednotek komplexu MRN. Kromě toho mutace MRE11 serinu 688 a 689 na alanin také vedla ke snížení stability MRE11. Nízká hladina PIH1D1 vede v souladu s předchozími pokusy k závadám ve dvou procesech regulovaných komplexem MRN: opravě dvouvláknových zlomů DNA a odstranění kovalentně vázané topoizomerázy TOPOII z DNA, způsobené inkubací buněk s etoposidem.

Závěrem, R2TP je důležitý pro stabilitu a funkci komplexu MRN a nestabilita komplexu MRN u pacientů s ATLD1 syndromem je pravděpodobně důsledkem zhoršené vazby mezi MRE11 a komplexem R2TP.

Dále jsme zkoumali regulaci lokalizace proteinu 53BP1 do jádra a do místa poškozené DNA. Zjistili jsme, že 53BP1 se váže na importin α a že úsek mezi aminokyselinou 1666 až 1686 v 53BP1 obsahuje klasický dvoudílný jaderný lokalizační signál, sloužící výlučně pro transport 53BP1 do jádra. Protože výsledky jiných laboratoří získané pomocí hmotnostní spektrometrie uvádějí několik posttranslačních modifikací 53BP1 v oblasti aa1666-1686, zkoumali jsme jestli tyto posttranslační modifikace mohou regulovat jaderný import 53BP1. Zjistili jsme, že serin 1678, který je pravděpodobně fosforylovaný v mitóze, je fosforylovaný kinazou CDK1 *in vitro*. Dále jsme zjistili, že mutace imitující permanentní fosforylaci tohoto místa silně snižuje interakci s importinem α a vede ke zhoršené jaderné lokalizaci 53BP1. Kromě toho jsme testovali účinek acetylace lysinu 1667. Naše výsledky ukazují že mutace tohoto místa výrazně snižují nukleární lokalizaci 53BP1.

Nakonec jsme se zabývali otázkou, proč se během mitózy 53BP1 neváže na místo poškozené DNA. Zjistili jsme, že fosforylace 53BP1 je zvýšená v mitóze a závisí na aktivitě kináz PLK1 a CDK1,

kteřé jsou vysoce aktivní během mitózy. Ukázali jsme, že PLK1 fosforyluje 53BP1 *in vivo* na serinu 1618 a že CDK1 může fosforylovat threonin 1609 a serin 1678. Serin 1618 a threonin 1609 jsou umístěny v doméně UDR, která je důležitá pro vazbu 53BP1 na ubiquitinované histony. 53BP1 s threoninem 1609 a serinem 1678 substituovanými kyselinou asparagovou, která mimikuje permanentní fosforylaci, se váže hůř na ubiquitin a do míst poškozené DNA v buňkách v G1 fázi. Podobně inhibice PLK1 a tím i snížení fosforylace serinu 1618 zvyšuje schopnost mitotických buněk opravit DNA pomocí nehomologní spojení konců. Zároveň vede obnova lokalizace 53BP1 do místa poškozené DNA v mitóze k přecitlivělosti na ozařování (20, 21).

Závěr

V této práci jsme objevili interakci mezi komplexem MRN a šaperonovým komplexem R2TP, která je zprostředkována CK2. Ukázali jsme, že komplex R2TP je důležitý pro stabilitu komplexu MRN a opravu DNA řízenou komplexem MRN. Našli jsme jaderný lokalizační signál 53BP1 a identifikovali jsme specifické posttranslační modifikace, které mohou regulovat lokalizaci 53BP1. Navíc jsme zjistili, že CDK1 a PLK1 fosforylují doménu UDR, což inhibuje vazbu 53BP1 na místa poškození DNA. Tato práce přinesla nové poznatky o funkci a regulaci zásadně důležitých opravných faktorů MRN a 53BP1.

References

1. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009 Oct 22;461(7267):1071-8. PubMed PMID: 19847258. Pubmed Central PMCID: 2906700.
2. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature genetics*. 2001 Mar;27(3):247-54. PubMed PMID: 11242102.
3. Ma Y, Lu H, Tippin B, Goodman MF, Shimazaki N, Koiwai O, et al. A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining. *Molecular cell*. 2004 Dec 03;16(5):701-13. PubMed PMID: 15574326.
4. Cejka P, Cannavo E, Polaczek P, Masuda-Sasa T, Pokharel S, Campbell JL, et al. DNA end resection by Dna2-Sgs1-RPA and its stimulation by Top3-Rmi1 and Mre11-Rad50-Xrs2. *Nature*. 2010 Sep 02;467(7311):112-6. PubMed PMID: 20811461. Pubmed Central PMCID: 3089589.
5. Bolderson E, Tomimatsu N, Richard DJ, Boucher D, Kumar R, Pandita TK, et al. Phosphorylation of Exo1 modulates homologous recombination repair of DNA double-strand breaks. *Nucleic acids research*. 2010 Apr;38(6):1821-31. PubMed PMID: 20019063. Pubmed Central PMCID: 2847229.
6. Sung P, Robberson DL. DNA strand exchange mediated by a RAD51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA. *Cell*. 1995 Aug 11;82(3):453-61. PubMed PMID: 7634335.
7. Maloisel L, Fabre F, Gangloff S. DNA polymerase delta is preferentially recruited during homologous recombination to promote heteroduplex DNA extension. *Molecular and cellular biology*. 2008 Feb;28(4):1373-82. PubMed PMID: 18086882. Pubmed Central PMCID: 2258756.
8. Wu L, Hickson ID. The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature*. 2003 Dec 18;426(6968):870-4. PubMed PMID: 14685245.
9. Wold MS. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annual review of biochemistry*. 1997;66:61-92. PubMed PMID: 9242902.
10. Lamarche BJ, Orazio NI, Weitzman MD. The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS letters*. 2010 Sep 10;584(17):3682-95. PubMed PMID: 20655309. Pubmed Central PMCID: 2946096.
11. Uematsu N, Weterings E, Yano K, Morotomi-Yano K, Jakob B, Taucher-Scholz G, et al. Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *The Journal of cell biology*. 2007 Apr 23;177(2):219-29. PubMed PMID: 17438073. Pubmed Central PMCID: 2064131.
12. Stewart GS, Maser RS, Stankovic T, Bressan DA, Kaplan MI, Jaspers NG, et al. The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell*. 1999 Dec 10;99(6):577-87. PubMed PMID: 10612394.
13. Hernandez D, McConville CM, Stacey M, Woods CG, Brown MM, Shutt P, et al. A family showing no evidence of linkage between the ataxia telangiectasia gene and chromosome 11q22-23. *Journal of medical genetics*. 1993 Feb;30(2):135-40. PubMed PMID: 8445618. Pubmed Central PMCID: 1016271.
14. Theunissen JW, Kaplan MI, Hunt PA, Williams BR, Ferguson DO, Alt FW, et al. Checkpoint failure and chromosomal instability without lymphomagenesis in Mre11(ATLD1/ATLD1) mice. *Molecular cell*. 2003 Dec;12(6):1511-23. PubMed PMID: 14690604.
15. Ochs F, Somyajit K, Altmeyer M, Rask MB, Lukas J, Lukas C. 53BP1 fosters fidelity of homology-directed DNA repair. *Nature structural & molecular biology*. 2016 Aug;23(8):714-21. PubMed PMID: 27348077.
16. Zimmermann M, de Lange T. 53BP1: pro choice in DNA repair. *Trends in cell biology*. 2014 Feb;24(2):108-17. PubMed PMID: 24094932. Pubmed Central PMCID: 3946699.
17. Panier S, Boulton SJ. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014 Jan;15(1):7-18. PubMed PMID: 24326623.
18. von Morgen P, Horejsi Z, Macurek L. Substrate recognition and function of the R2TP complex in response to cellular stress. *Frontiers in genetics*. 2015;6:69. PubMed PMID: 25767478. Pubmed Central PMCID: 4341119.

19. Horejsi Z, Stach L, Flower TG, Joshi D, Flynn H, Skehel JM, et al. Phosphorylation-dependent PIH1D1 interactions define substrate specificity of the R2TP cochaperone complex. *Cell reports*. 2014 Apr 10;7(1):19-26. PubMed PMID: 24656813. Pubmed Central PMCID: 3989777.
20. Orthwein A, Fradet-Turcotte A, Noordermeer SM, Canny MD, Brun CM, Strecker J, et al. Mitosis inhibits DNA double-strand break repair to guard against telomere fusions. *Science*. 2014 Apr 11;344(6180):189-93. PubMed PMID: 24652939.
21. Lee DH, Acharya SS, Kwon M, Drane P, Guan Y, Adelmant G, et al. Dephosphorylation enables the recruitment of 53BP1 to double-strand DNA breaks. *Molecular cell*. 2014 May 08;54(3):512-25. PubMed PMID: 24703952. Pubmed Central PMCID: 4030556.

Patrick Joel von Morgen

Marie Cibulkove 9, 140 00 Praha 4, Czech Republic, +420777827886, vonmorgenster@gmail.com

Research interests:

I am particularly interested in (the intersection between) DNA repair and cell cycle regulation and I would like to extend my knowledge in these fields during my postdoc. My PhD work has been focused on the involvement of the R2TP chaperone complex in double strand break repair and resulted in my first-author paper in *Oncogene*. I believe that scientific discussion is important and I enjoy reading, thinking and talking about science with my colleagues and friends.

Education:

2014 – 20XX PhD student at the Charles University in the Laboratory of Cancer cell biology, Institute of molecular genetics of the Academy of Sciences, Prague

Thesis: “The role of the R2TP complex in response to DNA damage and within cell cycle regulation.”

Supervisor: Zuzana Hořejší Co-supervisor: Libor Macurek

2012 – 2014 Master Biomedical Sciences at Leiden University, graduated (average: 8.3 out of 10)

2009 – 2012 Bachelor Biomedical Sciences at Leiden University, graduated (average: 7.8 out of 10)
Successfully completed the Honours College program (30 extra ECTS)

2003 – 2009 Pre-university education, graduated with distinction (average: 8.1 out of 10)

Publications:

MRE11 stability is regulated by CK2-dependent interaction with R2TP complex; **von Morgen P**, Burdová K, Flower TG, O’Reilly NJ, Boulton SJ, Smerdon SJ, [Macurek L](#), [Hořejší Z](#); *Oncogene* 2017

Substrate recognition and function of the R2TP complex in response to cellular stress; **von Morgen P**, [Hořejší Z](#), [Macurek L](#); *Frontiers in Genetics* 2015

Polo-like kinase 1 inhibits DNA damage response during mitosis. Benada J, Burdová K, Lidak T, **von Morgen P**, Macurek L. *Cell Cycle* 2015

Teaching experience:

2015/16 Lecturer in a course for starting PhD students (Advances in Molecular Biology and Genetics)

2012 – 2013 Tutoring bachelor students (physiology and basic statistics)

2009 – 2013 Tutoring pre-university students in Biology, Chemistry, Mathematics and Physics

2010 Teacher of pre-university students at the Schravenlant college

Internships:

2013 – 2014 32 weeks at the Laboratory of Cancer cell biology, Institute of molecular genetics of the Academy of Sciences, Prague (grade: 8.5 out of 10)

Topic: Role of novel posttranslational modifications in control of Polo-like kinase 1 activity

2012 – 2013 19 weeks at the department Pathology, LUMC Leiden University (grade: 7.5 out of 10)

Topic: The effect of trabectedin on myxoid liposarcoma cell lines

2012 16 weeks at the department Rheumatology, LUMC Leiden University (grade: 7.5 out of 10)

Topic: vinculin auto antigen presentation by HLA haplotypes

2011 16 weeks at the department Toxicogenetics, LUMC Leiden University (grade: 8.5 out of 10)

Topic: Effect of UV on RNA pol II stability in WT and TC-NER deficient cells

Grants:

GAUK Charles University Grant, providing a part of the stipend and bench fee (35.000 euro in 3 years)
LUF Competitive support, besides Erasmus and university grants, for my internship in Prague (700 euro)
BW-plus Competitive student grant for promising master students to orient on a PhD (1000 euro)

Courses and conferences:

2015, 2016 Cell Cycle, Checkpoint and Cancer meeting
and 2017 Talk on my ongoing research followed by discussion with international collaborators

2016 and Annual PhD conference of the Institute of Molecular Genetics
2017 Organization: responsible for the programme and inviting the speakers

2016 Conference: At the Intersection of DNA Replication and Genome Maintenance (Trieste)
poster presentation on the importance of the R2TP complex in MRN complex stability

2015 StratCan Interactive Summer School 2015: Targeting DNA Repair in Cancer
Talk on the role of the R2TP complex in DNA repair

2015 Coursera courses: Scientific writing, The Data Scientist's Toolbox and R Programming
2011 9b radiation protection, allowing me to work with radioactivity in Netherlands
2010 safe microbiological techniques, university course for working in the lab

Languages:

English:	Fluent	Czech:	Basic conversation
Dutch:	Native	German:	Basic conversation

Techniques:

During my internships and PhD I have mastered the following techniques, many of these techniques I used to obtain the results presented in published figures:

Tissue culture techniques (cancer cell lines and fibroblast lines, cell cycle synchronization, chemical treatment, IR, viability assays, siRNA, plasmid transfections, CRISPR), **molecular Cloning** (classic cloning methods, site directed mutagenesis, gateway cloning, Gibson assembly), **molecular methods** (CO-IPs, (peptide) pull downs, proximity ligation assay, protein purification, in vitro kinase assays, competitive binding, Immunostainings, Western blot, qPCR), **microscopy** (Fluorescent wide field and confocal microscopes, life cell imaging, automated acquisition on ScanR station), **use of bioinformatical tools:** (Graphpad/SPSS (statistics), ImageJ (image analysis), DIVA/flowjow (FACS), CFX manager (qPCR) sequence analysis, Perseus (Mass Spec))

Extracurricular activities:

PhD students representative of the IMG, functioning as a spokesperson for the PhD students and organizing activities within the PhD community including seminars and meet ups.

Volunteer for Dance4Water Prague, responsible for feedback and involved in teaching. By organizing dancing classes Dance4water Prague raised in 2016 256.712 CZK for WaterAid in Ethiopia. WaterAid provide some of the world's poorest people with access to clean water, sanitation and hygiene education.

I am an active sailing instructor.

References:

Zuzana Hořejší, PhD z.horejsi@qmul.ac.uk
Libor Macurek, PhD libor.macurek@img.cas.cz

Publications included in the thesis

MRE11 stability is regulated by CK2-dependent interaction with R2TP complex; **von Morgen P**, Burdová K, Flower TG, O'Reilly NJ, Boulton SJ, Smerdon SJ, Macurek L, Hořejší Z; **Oncogene** 2017 Aug 24;36(34):4943-4950

P. von Morgen designed and performed most of the experiments, created the figures and was actively involved in writing the manuscript.

Substrate recognition and function of the R2TP complex in response to cellular stress; **von Morgen P**, Hořejší Z, Macurek L; **Frontiers in Genetics** 2015 Feb; 6:69

P von Morgen wrote the manuscript and created most of the figures.

Nuclear import of 53BP1, discovery of 53BP1s NLS and regulation of nuclear import
von Morgen P, Lidak T, Hořejší Z, Macurek L; **Submitted manuscript**

P von Morgen performed the majority of the experiments and wrote the manuscript.

Polo-like kinase 1 inhibits DNA damage response during mitosis. Benada J, Burdová K, Lidak T, von Morgen P, Macurek L. **Cell Cycle** 2015 Jan; 14(2):219-231

P von Morgen purified proteins for the *in vitro* experiments.