



Warszawa 5 listopada 2024

dr hab. Justyna McIntyre
Pracownia Mutagenazy i Tolerancji Uszkodzeń DNA,
Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk
Tel. (22) 592-11-15
Email: jmcintyre@ibb.waw.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani Gabrieli Baranowskiej
pt. „**Rola DNA zależnych translokaz w utrzymaniu stabilności genomu *Schizosaccharomyces pombe***”
przygotowanej pod opieką dr hab. Doroty Dziadkowiec

Przedmiotem niniejszej pracy jest poznanie funkcji helikazy Srs2 w odpowiedzi na stres replikacyjny i jej porównanie z rolą translokaz Rrp1 i Rrp2 drożdży *Schizosaccharomyces pombe*.

Uważam, że przedmiot pracy jest oryginalny, a uzyskane wyniki wypełniają wiele luk w wiedzy na temat roli Srs2, Rrp1 i Rrp2 w utrzymaniu stabilności genomu w komórkach drożdży *S. pombe*. Uzupełniają one jednocześnie wcześniejsze odkrycia z pracowni Pani dr hab. Doroty Dziadkowiec, dotyczące roli białek zaangażowanych w proces homologicznej rekombinacji drożdży *Saccharomyces cerevisiae* oraz *S. pombe*. W ten sposób tworzy się pełniejszy obraz mechanizmów w obu organizmach modelowych, co z kolei rodzi wiele nowych, intrygujących pytań.

Część wyników opisanych w pracy została opublikowana w dwóch artykułach: *Journal of Cell Science* z 2020 r. i *Plos One* z 2024 r., przy czym w drugim z nich Doktorantka jest pierwszym autorem. Należy podkreślić, że wiele wyników zamieszczonych w rozprawie nie pojawia się w wymienionych publikacjach i zapewne są materiałem do kolejnych artykułów. Pani Gabriela Baranowska jest również współautorem dwóch innych prac naukowych, z których jedna jest tematycznie związana z prezentowaną rozprawą doktorską.

Oceniana rozprawa doktorska ma typowy układ i składa się ze streszczenia w języku polskim i angielskim, wstępu, opisu celu pracy, materiałów i metod, wyników, dyskusji, podsumowania, wykazu skrótów oraz spisu literatury.

Streszczenia w języku polskim i angielskim są tożsame i dość obszerne. Dokładnie opisują zakres wykonanych badań i otrzymanych wyników.

We **Wstępie** Doktorantka przedstawiła umiejętnie dobrane i najważniejsze informacje znakomicie wprowadzające czytelnika w tematykę pracy. Opisane zagadnienia dotyczące przebiegu homologicznej rekombinacji w replikacji i naprawie DNA, budowy i funkcji białek Rrp1, Rrp2 i Srs2 oraz regulacji odpowiedzi komórek na stres replikacyjny pomagają w analizie wyników uzyskanych w czasie badań. Jednocześnie, co chciałabym podkreślić, wstęp nie jest przeładowany nadmiarowymi informacjami, a zawarte schematy i rysunki, do których niejednokrotnie wracałam czytając wyniki i dyskusję, są bardzo pomocne.

Doktorantka nie ustrzegła się jednak pewnych pomyłek lub nieścisłości:

- na str. 18 znajduje się informacja, że polimerazy TLS popełniają błędy gdyż nie posiadają aktywności egzonukleazowej 3'→5'. To prawda, ale nie cała prawda. Istotne jest to, że polimerazy TLS mniej precyzyjnie dobierają nukleotydy ze względu na bardziej obszerną kieszeń katalityczną, a brak aktywności egzonukleazy powoduje, że nie są w stanie swoich błędów skorygować.
- na str. 20 Doktorantka pisze, że każda z 7 lizyn w ubikwitynie może wiązać się z białkiem doprowadzając do jego monoubikwitynacji. Być może stwierdzenie to jest efektem zbyt daleko idącego skrótu myślowego, ale nie jest prawdą. Monoubikwitynacja następuje poprzez wiązanie kowalencyjne glicyny będącej ostatnim aminokwasem ubikwityny, a resztą lizynową białka docelowego. Każda z 7 lizyn znajdujących się w cząsteczce ubikwityny może być ubikwitynowana, co może doprowadzić do utworzenia łańcucha poliubikwitynowego.
- Doktorantka pisze również mało precyzyjnie o „rodzaju lizyny”, która decyduje o kształcie wiązania (str. 20). To raczej nie rodzaj lizyny, ale to która z 7 reszt lizynowych w białku ubikwityny ulega dalszej ubikwitynacji.
- określenie Rad6 jako „ligaza E2” nie wydaje się mi odpowiednie, gdyż termin „ligaza ubikwityny” zarezerwowana jest raczej dla enzymów E3, a E2 zwykle się określać jako enzym koniugujący ubikwitynę.

Cel pracy jest poprzedzony wprowadzeniem umożliwiającym zrozumienie kontekstu. Doktorantka wyodrębniła cel główny oraz wypunktowała zamierzenia cząstkowe, które miały ją do niego doprowadzić.

Doktorantka w swych badaniach wykorzystwała szerokie spektrum metod *in vivo*, *in vitro* oraz mikroskopowych, które są wyczerpująco opisane w rozdziale **Materiały i Metody**. Liczne, tabelaryczne zestawienia wykorzystywanych szczepów drożdżowych, plazmidów, mutacji, przeciwciał, starterów, czy stosowanych czynników stresujących, ułatwiają porównania oraz sprawne wyszukanie informacji. Pewne braki, czy niedociągnięcia dotyczą jedynie:

- tabeli 3, prezentującej drożdżowe plazmidy użyte w pracy. W kolumnie marker selekcyjny dla plazmidów wykorzystywanych do analizy oddziaływań w systemie dwuhybrydowym podano bakteryjny marker selekcyjny (oporność na antybiotyk), a w przypadku plazmidów wykorzystywanych w *S. pombe* drożdżowy (*leu+* lub *ura+*).
- tabel 1 i 3, w których niepotrzebnie zastosowano różną konwencję opisywania źródeł pochodzenia szczepów i plazmidów wykorzystywanych w pracy.
- braku opisu podłoża bakteryjnego SOB.
- brak informacji skąd pochodziły enzymy Uba1 i Ubc4 użyte w reakcji ubikwitynacji *in vitro*.

Wyniki opisane w pracy dotyczą trzech głównych zagadnień:

- wpływu nadprodukcji białek Srs2, Rrp1 i Rrp2 w kontekście stresu replikacyjnego;
- roli tych białek w procesie poreplikacyjnej reperacji DNA;
- oddziaływań pomiędzy Rrp1 i PCNA i udziału Rrp1 w ubikwitynacji PCNA.

Uzyskane wyniki dotyczące pierwszego zagadnienia wskazują, że zbyt duża ilość Srs2 może hamować wzrost drożdży *S. pombe*, zarówno na podłożu z czynnikami genotoksycznymi, jak i bez nich, a poziom przeżywalności komórek nadprodukujących Srs2 w warunkach bez indukcji stresu genotoksycznego jest porównywalny do tego przy nadprodukcji Rrp1 i jednocześnie większy niż przy nadprodukcji Rrp2. Ponadto, toksyczny efekt nadprodukcji Srs2, podobnie jak Rrp1, ale raczej nie Rrp2, zdaje się nie zależeć od obecności mediatorów Swi5, Srf1, czy Rad51. Z kolei analiza mikroskopowa jąder komórkowych oraz utraty mikrochromosomu Ch16 zasugerowała, że obniżona żywotność komórek

nadprodukujących Srs2, podobnie jak Rrp1 i Rrp2, może wynikać z obserwowanych w nich problemach z replikacją DNA, segregacją i utrzymaniem stabilności chromosomów. Natomiast stwierdzenie kumulacji skupisk Rad52 i jednoniciowego DNA wskazało, na niewielki wzrost w komórkach nadprodukujących Srs2. Efekt ten jest wyraźnie słabszy od uprzednio obserwowanego w przypadku nadprodukcji Rrp1 i Rrp2. Jednocześnie nadprodukcja wszystkich trzech helikaz wpłynęła na spadek poziomu histonów obserwowany na przykładzie histonu H3, co wiąże się ze zwiększeniem ilości podwójnych pęknięć DNA w komórce. Doktorantka stwierdziła również, że w przypadku Rrp1 i Rrp2, które, w przeciwieństwie do Srs2, posiadają domenę ATP-azową oraz domenę ligazy ubikwitynowej E3 - RING, ich aktywności enzymatyczne mogą być bezpośrednio związane z regulacją ilości histonów na chromatynie. Wpływ Srs2 na poziom nukleosomów potwierdzono badając efekt stresu genotoksycznego na poziom histonu H3 w szczepie *srs2Δ*. Ponadto, badając zarówno fosforylację histonu H2A, fosforylację Chk1, jak i wydłużanie komórek, Doktorantka pokazała, że nadprodukcja każdej z trzech translokaz wiąże się z uruchamianiem punktów kontrolnych cyklu komórkowego, choć każda z nich w innym stopniu aktywuje dwie ścieżki: indukowaną pod wpływem stresu replikacyjnego i uszkodzeń DNA. W pracy zaproponowano odpowiedni model. Mgr Baranowska podjęła też próbę określenia relacji pomiędzy Srs2 i Rad51 w komórkach *S. pombe* w odniesieniu do *S. cerevisiae*.

W drugiej części **Wyników** Doktorantka weryfikowała rolę Srs2, Rrp1 i Rrp2 w poreplikacyjnej reperacji uszkodzeń DNA (PRR) poprzez analizę epistatyczną wrażliwości szczepów drożdży *S. pombe* pozbawionych genów kodujących te białka w zestawieniu z delecjami genów *rhp6+* lub *rhp18+*, kodujących główne enzymy PRR. Wyniki sugerują, że w komórkach *S. pombe* Rrp1 i Rrp2, ale nie Srs2, blokują ścieżkę HR, pełniąc podobną funkcję jak Srs2 drożdży *S. cerevisiae*.

Trzecie zagadnienie rozdziału **Wyniki** poświęcone jest analizie relacji Rrp1 z PCNA. Początkowo Doktorantka zweryfikowała, iż bezpośrednie oddziaływanie Rrp1 z PCNA i jego ubikwitynowaną formą jest niezależnie od wiązania się tych białek do DNA. Mgr Baranowska określiła również, że PCNA oddziałuje z Rrp1 przez jego domenę PIM, choć domena MIU może również w pewnym stopniu wpływać na tę interakcję. Następnie, w sposób jednoznaczny, zarówno za pomocą badań *in vivo*, jak i *in vitro*, przeprowadzonych na oczyszczonych białkach, Doktorantka pokazała, że Rrp1 może bezpośrednio ubikwitynować PCNA. Prawdopodobnym miejscem ubikwitynacji jest lizyna 164, a oprócz aktywności ligazy ubikwitynowej, także druga aktywność Rrp1 - translokazy ma istotny wpływ na utrzymanie komórkowego poziomu PCNA.

W tej części rozprawy doceniam szerokie spektrum podejść mających na celu jak najlepsze zgłębienie poszczególnych zagadnień badawczych, dających szerszą perspektywę, choć nie zawsze ułatwiających interpretację wyników. Mam jednak również kilka spostrzeżeń i uwag dotyczących rozdziału **Wyniki**, które w dużej mierze odnoszą się do sposobu zaprezentowania, czy też opisu wyników.

- Dla większości wyników przedstawionych na rycinach nie podano ilości powtórzeń przeprowadzonych doświadczeń. Dotyczy to zarówno wyników jakościowych, jak i ilościowych.
- Markery wielkości białek nie są opisane na rysunkach.
- Rycinę 9, na której przedstawiano lokalizację komórkową nadprodukowanych białek Rrp1, Rrp2 i Srs2 dobrze byłoby uzupełnić zdjęciami z markerem jądrowym tak jak w pracy Baranowska i wsp. 2024.
- na rycinie 20C brak informacji czego dotyczą znaki „-”, „i”, „+” w ścieżkach po prawej stronie od markera, co utrudnia interpretację.
- Dość dużym problemem przy lekturze i interpretacji wyników było używanie w ich opisie niejednoznacznie zdefiniowanego dla poszczególnych eksperymentów pojęcia „szczep wyjściowy” oraz braku odniesień gdzie znajdują się wyniki dla danego szczepu wyjściowego. Dotyczy to przede wszystkim opisu wyników tzw. testów kropelkowych przedstawionych na Ryc.12A i Ryc.22, które przedstawiają wpływ nadprodukcji białek Srs2, Rrp1 lub Rrp2, odpowiednio, w szczepach *swi5Δ*, *sfr1Δ*, *rad51Δ* lub *chk1Δ*, *cds1Δ*, *rad3Δ*, na wzrost komórek. Na pierwszy rzut oka „szczepami wyjściowymi”,

do których Doktorantka porównywała efekt nadprodukcji stosownych białek wydały się mi odpowiednie szczepy bez nadprodukcji badanych białek, dla których wyniki umieszczono na tych rycinach. Dopiero głębsza analiza wsparta lekturą publikacji naprowadziła mnie na trop sugerujący, że „szczep wyjściowy” to szczep typu dzikiego, dla którego wyniki znajdują się na Ryc.11A. Osobiście uważam, że przy takiej analizie wyników kontrole w szczepie typu dzikiego najlepiej byłoby pokazać na tym samym rysunku, a przynajmniej jasno powiedzieć gdzie umieszczone są wyniki kontroli. Znacznie ułatwiłoby to interpretację wyników.

- Niezrozumiały jest dla mnie komentarz zamieszczony na stronie 54 „...wcześniejsze dane pokazały obniżenie globalnego poziomu histonu H2A przy nadprodukcji Rrp1 i Rrp2. Co ciekawe, ilość fosforylowanej formy histonu H2A nie zmienia się, dlatego też stosunek formy modyfikowanej do niemodyfikowanej wzrasta przy nadprodukcji tych białek (Barg-Wojas, 2019)”. W cytowanej pracy nie natknęłam się na takie wyniki, a wyniki przedstawione na Ryc.20A i B wskazują znaczący wzrost poziomu fosforylowanej formy histonu H2A w stosunku do formy niemodyfikowanej przy nadprodukcji zarówno Srs2, jak i Rrp1 oraz Rrp2.

- W interpretacji wyników przedstawionych na Ryc.23 Doktorantka wskazuje, że „Długość komórek wzrasta przy nadprodukcji Srs2 oraz Rrp1 i Rrp2 w mutantach *chk1Δ* i *cds1Δ* (w stosunku do mutantu *rad3Δ*), co pokazuje, że aktywowane są zarówno szlaki odpowiedzi na uszkodzenie DNA, jak i stres replikacyjny”. Niestety w żadnym z tych przypadków nie pokazano, że różnice są znaczące. Dodatkowo, dalej Doktorantka pisze, że „W mutancie *chk1Δ*, wydłużenie komórek wywołane nadprodukcją Rrp2 jest podobne do tego, co w szczepie wyjściowym WT”. Jednakże na Ryc.23B wskazano, że różnica pomiędzy szczepem typu dzikiego, a *chk1Δ* jest statystycznie znacząca (wartość $p \leq 0,001$). Jak przedstawione na Ryc.23 wyniki mają się do wyników przedstawionych na Fig. 6A w publikacji z PLOS ONE z 2024 r. Czy są tożsame?

- Na Ryc. 33 panel lewy brakuje kontroli równego nałożenia np. w postaci GAPDH, co przy analizie różnic w poziomie białek Rrp1 i PCNA w ekstraktach białkowych byłoby pomocne.

W Dyskusji Doktorantka zrekapituowała przedstawione w pracy wyniki i przedstawiła je w kontekście mechanizmów homologicznej rekombinacji drożdży rozszczepkowych, piekarniczych i do pewnego stopnia, człowieka. Jest to o tyle ciekawe, ale też i trudne, ponieważ, o ile Srs2 ma swoje homologii w obu gatunkach drożdży, które zdają się pełnić nieco odmienne funkcje, o tyle brak jego homologa w komórkach ludzkich. Doktorantka odniosła się do wszystkich wątków swojej pracy badawczej, w tym do różnej lokalizacji komórkowej Srs2, wpływu nadprodukcji białek Srs2, Rrp1 i Rrp2 na aktywację punktów kontrolnych cyklu komórkowego, czy dynamikę histonów, a także zależnej od Srs2 regulacji Rad51.

Z kolei odnosząc się do wyników epistatycznej analizy wrażliwości na czynniki genotoksyczne szczepów pozbawionych genów kodujących Srs2, Rrp1 lub Rrp2 w połączeniu z zablokowaniem poszczególnych ścieżek poreplikacyjnej reperacji DNA, Doktorantka skonfrontowała je z odpowiednimi relacjami Srs2 drożdży *S. cerevisiae*. Zaproponowała również model regulacji szlaków poreplikacyjnej reperacji DNA dla obu gatunków drożdży sugerujący, iż rolę blokera homologicznej rekombinacji, jaką Srs2 pełni w komórkach *S. cerevisiae*, w komórkach *S. pombe* przejął kompleks Rrp1/Rrp2, który dodatkowo uczestniczy w bezbłędnej ścieżce poreplikacyjnej reperacji DNA tzw. *template switch*.

W dyskusji dotyczącej Rrp1-zależnej ubikwitynacji PCNA (prawdopodobnie lizyny 164), odnosząc się do badań w komórkach ludzkich, Doktorantka proponuje, że taka modyfikacja PCNA mogłaby nie tylko regulować wybór ścieżki poreplikacyjnej reperacji DNA, ale także mieć znaczenie w prawidłowej replikacji.

Bardzo doceniam, iż Doktorantka w **Dyskusji** wskazuje, które aspekty prowadzonych badań pozostają nadal nierozwiązane i jakie dalsze kroki należałoby podjąć, by je wyjaśnić.

W **Podsumowaniu** Doktorantka przedstawiła najważniejsze wnioski wyciągnięte na podstawie uzyskanych wyników.

Lektura rozprawy doktorskiej nasunęła mi kilka uwag/pytań. Chciałabym poznać opinię Doktorantki na ich temat.

1. Na jakiej podstawie Doktorantka przypuszcza (rozdział Dyskusja str. 88), że Srs2 *S. pombe* posiada motywy PIM i SIM, zidentyfikowane w białku Srs2 *S. cerevisiae*?
2. W mutancie genu *rad3+* (Ryc. 23) widoczne jest znaczące skrócenie komórek. Jak można interpretować ten efekt?
3. Z czego może wynikać efekt toksyczności nadprodukcji Rrp1 w szczepie *pcn1:3FLAG::kanMX6*?
4. Czy mając na uwadze jądrową lokalizację Srs2 w komórkach *S. pombe* można rozważyć potencjalny udział Srs2 w mechanizmie jądrowej odpowiedzi na uszkodzenia DNA (n-DDR, ang. *nucleolar-DNA Damage Response*)?

Drobne błędy edytorskie:

- niektóre zwroty, czy też tłumaczenia pojęć zaczerpniętych z języka angielskiego są dość karkołomne i przez to mniej zrozumiałe np. „na ścieżce zależnej od syntezy parowania nici” (str. 12);
- należałoby ujednolicić pisownię SUMOilowane vs. sumoilowane;
- w podpisie pod Ryc.10 warto byłoby zaznaczyć, że transformowano szczep *srs2Δ*;
- str. 33 – płytka YES;
- str. 41 – używanie w opisie oznaczeń p41, p42, p81 jest pewnym skrótem;
- nie używałabym określenia „pęknięcia DSB”, a podwójne pęknięcia DNA lub DSB po rozwinięciu skrótu angielskiego.
- str. 55 opis pod Ryc. 21. „obserwowano po mikroskopem długości szczepu” jest mało fortune
- zwroty „utrata przeżywalności indukcji ekspresji badanych genów” jest niezrozumiałe (opis pod Ryc. 11, 12, etc...)
- kolokwializmy laboratoryjne np. „cięższe prążki” zamiast wolniej migrujące białka (str.74)
- „w komórkach nadprodukujących formę wyjściową Rrp1 w szczepie *pcn1K164R* nie dochodzi do zmniejszenia ilości PCNA w stosunku do wektora” – skrót myślowy

Konkludując, rozprawa Pani Gabrieli Baranowskiej dostarcza istotnych wyników, które rozszerzają naszą wiedzę na temat roli białek Srs2, Rrp1, Rrp2. Odkrycia te mają znaczenie nie tylko dla zrozumienia procesów zachodzących w komórkach *S. pombe*, ale także wskazują różnice w funkcjonowaniu białek regulujących homologiczną rekombinację w komórkach *S. pombe* i *S. cerevisiae*. Przedstawione w rozprawie wyniki podkreślają potrzebę głębszego zrozumienia mechanizmów działających również w komórkach wyższych eukariontów. Szerokie spektrum zastosowanych podejść podkreśla wnikliwość w podejściu do tematu. Dostrzeżone błędy, czy niedociągnięcia, które z obowiązku recenzenta musiałam wskazać, nie wpływają negatywnie na moją ogólną pozytywną ocenę zaprezentowanej rozprawy.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska pani Gabrieli Baranowskiej spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscyplin Naukowych Biotechnologii, Nauk Medycznych oraz Inżynierii Biomedycznej Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Gabrieli Baranowskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie biotechnologia.