



Kraków, 31 października 2024

r.

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków

dr hab. Wojciech Strzałka
Kierownik Zakładu
Biotechnologii Roślin
Tel.: (12) 66 46 410
Fax: (12) 66 46 902
E-mail: wojciech.strzalka@uj.edu.pl

Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Gabrieli Baranowskiej pt. „Rola DNA zależnych translokaz w utrzymaniu stabilności genomu u *Schizosaccharomyces pombe*”.

Dziedziczenie materiału genetycznego przez komórki potomne jest warunkiem niezbędnym dla propagacji życia na ziemi. Właściwości komórek, ich reakcja na czynniki zewnętrzne, jak i wewnętrzne, są odzwierciedleniem m.in. informacji zaszyfrowanej w jądrowym DNA. Zdolność komórek potomnych do zachowania cech rodzicielskich w formie niezmienionej wiąże się m.in. z koniecznością posiadania aktywnych mechanizmów, które wspierają utrzymanie stabilności genomu. Uważa się, że stabilność genomowa jest korzystna szczególnie dla komórek wyższych eukariontów, rozmnażających się generatywnie, cechujących się złożoną budową i posiadających wyspecjalizowane tkanki, ponieważ zwiększa ona szansę na ich prawidłowe działanie w kolejnych pokoleniach. W przypadku organizmów znajdujących się na niższym szczeblu drabiny ewolucyjnej, np. jednokomórkowych drożdży, działanie mechanizmów wspierających stabilność genomu może mieć jeszcze drugie oblicze. Nie można bowiem wykluczyć, że mechanizmy te wpływają negatywnie na proces dostosowania komórek do panujących warunków środowiskowych wskutek ograniczenia plastyczności informacji genetycznej, zwłaszcza w przypadku organizmów rozmnażających się głównie bezpłciowo.

Przedstawiona do oceny praca doktorska została zrealizowana pod kierunkiem Pani dr hab. Doroty Dziadkowiec. Praca ta dotyczy badań nad rolą wybranych translokaz DNA w utrzymaniu stabilności genomu drożdży roszczepkowych (*Schizosaccharomyces pombe*). Obiektami badań Pani mgr Gabrieli Baranowskiej były białka Srs2, Rrp1 i Rrp2.

Praca doktorska Pani mgr Baranowskiej ma układ charakterystyczny dla rozpraw doktorskich. W jej skład wchodzi części takie jak: streszczenie w języku polskim i angielskim, spis treści, wstęp, cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie, wykaz skrótów, oraz literatura. Wstęp napisany jest w sposób przystępny wprowadzając czytelnika w poruszaną tematykę badawczą. Doktorantka omówiła w nim m.in. budowę i rolę drożdżowych translokaz Srs2, Rrp1 i Rrp2, opisała model naprawy uszkodzonego DNA na drodze rekombinacji homologicznej, oraz zaprezentowała, zależne od rodzaju modyfikacji potranslacyjnych białka PCNA, możliwe scenariusze prowadzące do odblokowania widełek replikacyjnych. Po zapoznaniu się z treścią tej części pracy doktorskiej wnioskuję, że Pani mgr Baranowska posiada szeroką wiedzę w tematyce, która stała się przedmiotem jej badań. We wstępie oraz dyskusji można znaleźć szereg starannie dobranych odnośników literaturowych, ich całkowita liczba wynosi 123. Do wykonania badań Doktorantka wykorzystwała szereg technik eksperymentalnych. Metodyka z której korzystała w większości została opisana w sposób jasny i precyzyjny.

Jeżeli chodzi o cele recenzowanej rozprawy, to zostały one klarownie zdefiniowane. Ich realizacja niewątpliwie wymagała dużych nakładów pracy. Doktorantka prawidłowo zaplanowała i wykonała opisane eksperymenty, nie zapominając o odpowiednich układach kontrolnych. Do najważniejszych wniosków, które można wyciągnąć na podstawie wyników uzyskanych przez Doktorantkę należą:

- i) Nadekspresja genów kodujących białka Srs2, Rrp1 lub Rrp2 powoduje zahamowanie wzrostu komórek *S. pombe* i niestabilność ich chromosomów,

- ii) Białka Srs2, Rrp1 i Rrp2 regulują w różny sposób aktywację punktów kontrolnych cyklu komórkowego,
- iii) Nadekspresja genu kodującego helikazę Srs2 potęguje zmiany wywołane nadekspresją genu kodującego białko Rad51,
- iv) Funkcja białka Srs2 w poreplikacyjnej naprawie DNA w komórkach *S. pombe* jest inna niż w komórkach *S. cerevisiae*,
- v) Ścieżka poreplikacyjnej naprawy DNA zależnej od rekombinacji homologicznej u *S. pombe* jest hamowana przez białka Rrp1 i Rrp2. Co więcej, działanie tej ścieżki wymaga udziału białka Srs2,
- vi) Interakcja pomiędzy PCNA a białkiem Rrp1 zachodzi przy udziale motywu PIM,
- vii) Białko Rrp1 posiada aktywność ligazy ubikwityny i uczestniczy w ubikwitynacji ludzkiego PCNA,
- viii) Białka Rrp1 i Rrp2 działają w ramach ścieżki naprawy DNA związanej z przełączaniem matrycy.

W trakcie lektury ocenianej rozprawy nasunęło mi się szereg pytań, o odpowiedź na które chciałbym prosić Doktorantkę:

- 1) Strona 13: Autorka napisała „Pierwsze badania nad białkami Rrp1 i Rrp2 pokazały, że pojedyncze mutanty *rrp1Δ* i *rrp2Δ* oraz podwójny *rrp1Δrrp2Δ* nie wykazują wrażliwości na związki genotoksyczne takie jak CPT, HU czy MMS (Dziadkowiec et al., 2009).” Proszę o komentarz dotyczący braku wrażliwości omawianych mutantów na związki genotoksyczne. Wydaje się bowiem mało prawdopodobne, aby badane szczepy były całkowicie niewrażliwe na działanie np. metanosulfonianu metylu.
- 2) Strona 13: Autorka napisała „Również podwójne mutanty *rad51Δrrp1Δ* i *rad51Δrrp2Δ*, jak i potrójny mutant *rad51Δrrp1Δrrp2Δ* nie wykazują zwiększonej wrażliwości,...”, strona 14: „Podwójne mutanty *sfr1Δrrp1Δ* i *sfr1Δrrp2Δ* nie wykazują zwiększonej wrażliwości na związki genotoksyczne, co sugerowałoby działanie białek Rrp1.....”. Proszę o wyjaśnienie, względem jakiego układu badane mutanty nie wykazują zwiększonej wrażliwości?
- 3) Strona 18: Autorka napisała „Szlak TLS związany jest z chwilową zamianą polimerazy DNA na polimerazy TLS.” Biorąc pod uwagę, że polimerazy TLS są polimerazami DNA proszę o wyjaśnienie jaką polimerazę DNA Doktorantka ma na myśli pisząc o jej zamianie na polimerazy TLS?
- 4) Strona 25: Materiały i metody. W tabeli zawierającej spis szczepów drożdży Doktorantka używa sformułowań: kolekcja laboratorium, AMC Carr i Hiroshi Iwasaki. Mam zatem pytanie: o jakie laboratorium chodzi, co oznacza skrót AMC Carr i z jakiego laboratorium pochodzi Hiroshi Iwasaki?
- 5) W materiałach Doktorantka używa stężenia procentowego. Czy jest to stężenie wagowo/wagowe czy wagowo/objętościowe?
- 6) Strona 28: Proszę o przedstawienie mechanizmu działania związków wymienionych w tabeli 5.
- 7) Strona 40: W podrozdziale 3.2.21 Doktorantka opisuje użycie enzymu His-Uba1 oraz His-Ubc4. Z jakiego organizmu pochodziły te białka i jak zostały oczyszczone? Ponadto, dlaczego badając aktywność ligazy ubikwityny Rrp1 w testach *in vitro* używano ludzkich białek ubikwityny i PCNA? Jak jest uzasadnienie badania aktywności enzymu drożdżowego z wykorzystaniem ludzkich białek?
- 8) Tytuły części rycin (np. ryc. 9, 11, 13, etc.) zamiast informować o tym, co było celem eksperymentu, którego wynik jest przedstawiony, informują o konkretnym jego rezultacie. Jest to dla mnie niecodzienne podejście utrudniające czytelnikowi zorientowanie się co było przedmiotem badania. Mam w związku z tym pytanie: skąd taka koncepcja konstruowania tytułów rysunków?
- 9) Strona 44, 45, 59: W opisie rycin 11, 12 i 24 pojawia się zdanie „Utrata przeżywalności indukcji ekspresji badanych genów przez 48 godzin na minimum trzech transformantach (B).” Proszę o wyjaśnienie co Doktorantka ma na myśli w tym zdaniu.
- 10) Strona 46: Dlaczego na rycinie 13B nie umieszczono wyników analizy statystycznej?
- 11) Strona 48: Autorka napisała „Można zatem wnioskować, że nadmiar Srs2 powoduje stres replikacyjny, gdyż wzrasta ilość fragmentów jednoniciowego DNA, jednak jest on najmniej silny w porównaniu do Rrp1 czy Rrp2.” Pomijając konstrukcję tego zdania, gdyż powinno być, jak rozumiem: „... w porównaniu do nadmiaru Rrp1 czy Rrp2” oraz zamiast „najmniej silny” powinno być: „słabszy”, proszę o uzasadnienie

powyższego stwierdzenia. Na rycinie 16A nie umieszczono informacji o istotności statystycznej różnicy w ilości fragmentów jednoniciowego DNA pomiędzy układem +p42HA a +Srs2. Ponadto proszę o przedstawienie zestawienia dla układów +p42HA, +Srs2, +Rrp1 i +Rrp2 na jednym wykresie.

12) Strona 49: Autorka napisała „Zaobserwowano, że globalny spadek ilości histonów na DNA jest u *S. cerevisiae* reakcją na uszkodzenia DNA (Hauer et al., 2017).” Wydaje mi się, że to DNA jest nawinięte na histony a nie histony na DNA. Proszę o opinię Doktorantki w tej sprawie.

13) Strony 50, 51, 66, 81: Na podstawie jakiej liczby powtórzeń uzyskano wyniki przedstawione na rycinie 17B, 18B, 18C, 30B oraz 42?

14) Strona 51: Czy na rycinie 18A wykrywano białko Rrp1 oraz Rrp2 czy GFP-Rrp1 i GFP-Rrp2?

15) Strona 52: Dlaczego na rycinie 19B nie ujęto danych dla mutantu *rrp1Δ* oraz *rrp2Δ*? Czy Doktorantka może przedyskutować jaki będzie efekt zastosowania osobno HU i CPT?

16) Strona 52: Autorka napisała „Sugerować, to może, że Srs2 podobnie jak to pokazano dla Rrp1 i Rrp2 (Barg-Wojas, 2019, Barg-Wojas et al., 2020), bierze udział w ustalaniu równowagi nukleosomów”. Proszę o komentarz co Doktorantka ma na myśli pisząc o: „równowadze nukleosomów”.

17) Strona 54: Dlaczego przy omawianiu wyniku przedstawionego na rycinie 21B nie omówiono rezultatów dla układu z nadprodukcją Rrp2 i Rrp2, a jedynie odniesiono się do danych literaturowych? Informacje te, z przyczyn dla mnie niejasnych, pojawiają się później (strona 56).

18) Strona 59. Dlaczego na rycinie 24B nie umieszczono wyniku dla układu z nadprodukcją Rrp2?

19) Strona 61: Proszę o komentarz: jaka jest możliwa przyczyna spadku o około 20% żywotności drożdży posiadających konstrukt p81-FLAG, co obrazuje rycina 26?

20) Strona 61: Autorka napisała „Biorąc więc pod uwagę, że nadprodukcja białka Srs2 w szczepie *nmtP3-GFP-rad51* powoduje zwiększenie defektu wzrostowego (Ryc. 24 A), nie dziwi brak różnic w ilości włókien Rad51 na DNA pod wpływem nadprodukcji Srs2 w porównaniu do kontroli (Ryc.26 A i B)”. Proszę o szersze wyjaśnienie rozumowania, które doprowadziło do tego stwierdzenia.

21) Strona 61: Proszę o przedstawienie danych pokazujących zahamowanie wzrostu drożdży nadprodukujących GFP-Rad51.

22) Strona 62: Rycinę 27 autorka zatytułowała: „Srs2 oddziałuje z C-końcowym fragmentem Rad51”. Wydaje mi się, że wykorzystany układ eksperymentalny nie pozwala na udowodnienie wprost bezpośredniego oddziaływania pomiędzy białkami. Proszę o komentarz w tej sprawie. Proszę również o informacje, co Doktorantka rozumie przez stwierdzenie: „interakcja średniej mocy”?

23) Strona 66: Autorka napisała „Skonstruowano potrójne mutanty delecyjne, *rhp18Δrrp1Δsrs2Δ* i *rhp18Δrrp2Δsrs2Δ*, i stwierdzono, że cechuje je zmniejszona wrażliwość zbliżona do podwójnego mutantu *rhp18Δsrs2Δ*.” Pisząc o zmniejszonej wrażliwości (nie jest jasne na co?) tych potrójnych mutantów proszę o komentarz: do jakiego szczepu odnosi się to porównanie?

24) Strona 70: Rycina 32, panel IP-GFP. Na jakiej podstawie Doktorantka stwierdza, że przeciwciała anti-FLAG wykrywają ubikwitynowane, a nie przykładowo: sumoilowane, PCNA?

25) Strona 70, 71: Rycina 32 i 33. Dlaczego w obrazie ekstraktu białkowego (EB) w ścieżce oznaczonej +p41-EGFP nie jest widoczny sygnał pochodzący od białka GFP pomimo użycia przeciwciał anti-GFP? Ponadto, od czego może pochodzić sygnał obserwowany na rycinie oznaczonej IP-GFP, lokujący się powyżej białka Rrp1-EGFP? Analizując obraz uzyskany dla kontroli negatywnej (p41-EGFP/Pcn1-FLAG, panel IP-GFP) przedstawiony na rycinie 33 oraz dużą ilość wykrytego białka Rrp1-MIU stwierdzenie, że oddziałuje ono z PCNA jest dla mnie mocno wątpliwe. Chciałem także zapytać Doktorantkę, czy mówienie o interakcji pomiędzy białkami jedynie na podstawie wyniku immunoprecypitacji z wykorzystaniem ekstraktów białkowych, jest w pełni uprawnione?

26) Strona 73: Skąd pewność, że sygnał obserwowany na rycinie 35, opisany jako Pcn1-Ub2-FLAG, to poliubikwitynowane PCNA? Wyniki, uzyskane z użyciem przeciwciał anti-Ub dla wszystkich badanych szczepów drożdży, są trudne i ryzykowne do interpretacji z uwagi na ich słabą jakość.

27) Strona 78: Na rycinie 39 przedstawiono wyniki badań, w których wykorzystano szczep *S. pombe* produkujący białko PCNA z metką FLAG. Jakie było uzasadnienie wykorzystania takiego układu i jakie były oczekiwane rezultaty skoro wiadomo, że takie białko ma negatywny wpływ na wzrost komórek drożdży?

28) Strona 80: Autorka pisze: „Jedynie delikatnemu polepszeniu na HU ulega fenotyp szczepu *pcn1K164R* (Ryc. 42)”. Proszę o wyjaśnienie co Doktorantka rozumie przez stwierdzenie „delikatnemu polepszeniu... ulega

fenotyp”. Według mojej oceny przedstawionego wyniku wzrost omawianego szczepu na hydroksymoczniku jest prawie taki sam, lub nieco gorszy niż szczepu dzikiego. Proszę o komentarz w tej sprawie.

29) Strona 87: Autorka napisała: „Pokazano, także, że usunięcie genów *rrp1+* i *rrp2+* w mutancie *rhp6Δ* ratuje wrażliwość na HU, kampototecynę (CPT), MMS,.....”. Na podstawie analizy tych wyników wydaje mi się, że jest dokładnie odwrotnie tzn. mutanty te są mniej wrażliwe na wymienione czynniki w porównaniu do mutantu *rhp6Δ*. Proszę o komentarz w tej sprawie. Proszę też o wyjaśnienie, co to znaczy, że „wrażliwość została uratowana”?

30) Strona 90: Autorka napisała „Modyfikacja PCNA na lizynie 164 przyczynia się do zakończenia replikacji w odpowiedzi na stres replikacyjny”. Mam prośbę o doprecyzowanie jaką modyfikację PCNA, prowadzącą do zakończenia replikacji DNA, Doktorantka miała na myśli?

Pozostałe uwagi:

- 1) Strona 20: Na rysunku 6, dotyczącym kaskady enzymatycznej prowadzącej do ubiquitynacji substratu, zabrakło mi przedstawienia ścieżki prowadzącej do multiubiquitynacji.
- 2) Strona 20: Doktorantka napisała: „Podobnie jak ubiquitynacja, jest to proces kaskadowy zależny od trzech ligaz: E1, E2 i E3.” Według mojej najlepszej wiedzy białka E1 i E2 nie są ligazami ubiquityny.
- 3) Strona 20: Na omawianej stronie znalazło się niefortunne sformułowanie: „Modyfikację SUMO PCNA.....”. Należałoby raczej napisać: „Modyfikację PCNA przez SUMO.....”
- 4) W podrozdziale 3.2.5 (metody) Doktorantka podaje objętości plazmidu którą brała do transformacji, jednak nie podaje jego stężenia. Opis trawienia enzymami restrykcyjnymi jest zbyt ogólny, a informacja na temat ligacji wstawki do wektora w stosunku 3:1 nie informuje czytelnika czy jest to stosunek wagowy, molowy, czy jeszcze inny. W związku z powyższym powtórzenie tych doświadczeń przez innego eksperymentatora wydaje się być mocno utrudnione.
- 5) W legendzie ryciny 27 zabrakło mi podstawowych informacji np. o tym, który plazmid pełni rolę „przynęty”, a który „ofiary”, czy też opisu znaczenia skrótów 51C i 51N.
- 6) Na stronie 35 nie podano stężenia roztworu DAPI.
- 7) Strona 47: W opisie ryciny 14 nie umieszczono informacji o nazwie szczepu drożdży, który był transformowany.
- 8) Strona 37: Uważam, że tytuł tabeli 9 „warunki transferu mokrego używane w pracy” nie odpowiada jej zawartości, gdyż brak w niej takich informacji.
- 9) Strona 30: W opisie metod Doktorantka używa wyrażenia: ekspresja białka. Wyrażenie „ekspresja” dotyczy genu, a w przypadku białka powinno się używać raczej np. słowa: „produkcja”. W stwierdzeniu: „Do reakcji PCR...” użycie słowa: „reakcji” jest zbędne, ponieważ jest ono już zawarte w skrócie: „PCR”.
- 10) Strona 66: Pomiędzy ryciną 39 a tekstem występuje rozbieżność. Na rycinie 30 widnieje informacja, że użyto hydroksymocznika o stężeniu 6 mM ,natomiast w tekście pojawia się informacja o 12 mM stężeniu tego związku.
- 11) Strona 74: Doktorantka napisała „...ligaza E2...” zapewne chodzi o enzym E2, a nie ligazę.
- 12) Omawiając wybrane białka Doktorantka nie zawsze podaje ich pochodzenie. Warto byłoby w takich przypadkach używać dodatkowo skrótów nazwy rodzajowej i gatunkowej np. dla *Saccharomyces pombe* (Sp) co znacznie ułatwiłoby czytelnikowi zorientowanie się o białkach z jakiego organizmu pisze Doktorantka.
- 13) Na stronie 89 znalazło się niefortunne sformułowanie: „...poliubiquitynacja PCNA przez lizynę 164...” wskazujące, że PCNA jest poliubiquitynowane przez lizynę 164. Znacznie lepiej byłoby napisać: „poliubiquitynacja lizyny 164 białka PCNA”.
- 14) W mojej opinii opisy większości rysunków są zbyt skromne. Nie zawierają one wystarczającej legendy umożliwiającej łatwe odszyfrowanie informacji w nich zawartych.

Pomimo moich uwag krytycznych przedstawionych w recenzji stwierdzam, że rozprawa mgr Gabrieli Baranowskiej jest wartościowa i 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 z późn. zm.) i wnioskuje do Rady Dyscyplin Naukowych Biotechnologii, Nauk Medycznych oraz Inżynierii Biomedycznej Uniwersytetu Wrocławskiego o

dopuszczenie mgr Gabrieli Baranowskiej do dalszych etapów postępowania ws. nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie biotechnologia.

Wojciech
Strzałka

Elektronicznie podpisany przez
Wojciech Strzałka
DN: c=PL, sn=Strzałka,
givenName=Wojciech
Kazimierz, cn=Wojciech Strzałka,
serialNumber=PNOPL-77072907
113
Data: 2024.11.08 10:12:19
+01'00'