

Prof. dr hab. Igor Konieczny
Zakład Biologii Molekularnej
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed
Uniwersytet Gdański

Gdańsk 15.03.2022

Recenzja pracy doktorskiej Jakuba Muraszko na temat: „*Właściwości biochemiczne Rrp1 istotne dla utrzymania stabilności genomu Schizosachosomyces pombe*”

Przedstawiona do oceny praca doktorska dotyczy zagadnień związanych z analizą mechanizmów warunkujących stabilność genomów. Autor opisuje eksperymenty badające białko *Schizosachosomyces pombe* Rrp1. Z uwagi na fakt, że rekombinacja homologiczna to jeden z podstawowych ciągle nie do końca poznanych mechanizmów naprawy DNA, wybór tematu pracy był jak najbardziej uzasadniony a uzyskane wyniki poszerzają naszą wiedzę w tym zakresie i stanowią istotny wkład nie tylko dla zrozumienia mechanizmów w *S. pombe*.

Praca została wykonana w na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego w Zakładzie Biotransformacji. Promotorem jest dr hab. Dorota Dziadkowiec. Część eksperymentów została wykonana podczas półrocznego pobytu doktoranta w Tokio Instytut of Technology w laboratorium prof. Hiroshi Iwasaki. Rozprawa to 148 stron tekstu, zawiera 58 rycin i 11 tabel. Rozprawa ma tradycyjny układ. Po stronie tytułowej umieszczono obszerne podziękowania, informacje o przeprowadzonych badaniach, a następnie streszczenie pracy przygotowane w języku polskim i w języku angielskim. Badania opisane w pracy były współfinansowane z programu NCN PRELUDIUM a wyniki opublikowane w pracach wydanych w renomowanych czasopismach *Nucleic Acid Research* i *Journal of Cell Science*.

Streszczenie zawiera wszystkie niezbędne informacje dotyczące zawartości pracy. Kolejne rozdziały pracy to: Spis treści, Wstęp, Cele pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie, Wykaz skrótów i Bibliografia.

Wstęp dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienia poruszane w pracy. Znajdują się w nim wszystkie niezbędne informacje. Autor opisuje *S. pombe* jako organizm modelowy, mechanizm rekombinacji homologicznej oraz białka w nim uczestniczące a w szczególności Rad51, mediatory rekombinacji Rrp1 i Rrp2 oraz Snf2. Zamieszczone ryciny ułatwiają zrozumienie tekstu. Czasami w odczuciu recenzenta tekst zawiera informacje zbyt podstawowe. Niestety wkrada się wiele błędów natury stylistycznej. Częste stosowanie niepoprawnego szyku zdania jest zapewne wynikiem używania źródeł angielskojęzycznych. W stosunku do rzeczowników policzalnych regularnie używany jest termin ilość a nie prawidłowy termin liczba. Szkoda, że pierwsze zdanie wstępu, zarazem będące pierwszym zdaniem pracy, jest napisane w sposób niejasny, błędny, mija się z logiką formalną i trzeba domyslać się intencji autora. Uwaga ta dotyczy też innych zdań. Wielokrotne stosowanie pełnych łacińskich nazw gatunkowych jest nieuzasadnione. W podpisach do rycin składających się z kilku części (A, B, C itd.) brak jest opisu tych części. Podpisy pod rycinami są zazwyczaj bardzo lakoniczne, często tylko jednozdaniowe. Podsumowując wstęp należy ocenić za dobry pod względem zawartości merytorycznej. Mankamenty dotyczą formy i stylu opisu. Liczne błędy językowe i niepoprawna składnia bardzo utrudniają lekturę.

W rozdziale drugim, doktorant w zwięzły sposób określił cele pracy, których realizacja została opisana w kolejnych rozdziałach.

Rozdział Materiały i metody zawiera informacje o szczepach, plazmidowym DNA, oligonukleotydach, przeciwciałach, podłożach i pożywkach hodowlanych oraz dokładne opisy stosowanych metod. Opisy są na tyle szczegółowe, że powinny pozwolić na powtórzenie doświadczeń. W tekście pojawiają się niezręczności i błędy językowe. Podczas reakcji PCR dochodzi do amplifikacji DNA a nie namnożenia DNA. Również lepiej nie używać terminu namnażanie w kontekście plazmidowego DNA (patrz np. Tabela 1). Termin namnażanie jest adekwatny przy opisach procedur związanych z cząstkami fagów. Stosowanie złej składni oraz wkradający się żargon laboratoryjny utrudnia lekturę tekstu (np. str. 50 „...roztwór białka uzyskany po dializie był ładowany na kolumnę...”). Autor nie używa słowa temperatura czy też skrótu temp. . W tekście powtarza błąd gramatyczny polegający na zastosowaniu złej deklinacji. Stosuje formę dopełniacza a nie mianownika, a więc dodaje białka a nie dodaje białko. Również dyskomfort czytelnika budzi

stwierdzenie, że mieszanina reakcyjna składa się z buforu lub, że składa się z buforu i wody. W opisach lepiej po prostu wymienić skład mieszaniny a bufor może tylko służyć do jej przygotowania. Eksperymentów nie „procesujemy” (patrz str. 54) a je po prostu przeprowadzamy. DNA to kwas więc powinno stosować się rodzaj męski a nie nijaki, a więc formy DNA to np. dwuniciowy kolisty a nie dwuniciowe koliste (patrz str. 54). Wkradły się też błąd redakcyjny zła numeracja rycin lub zła kolejność ich umieszczenia (str. 55). Wszystkie te błędy i nieprawidłowości powodują, że tekst bardzo traci na jakości i utrudniona jest jego lektura. Możliwe, że znów przyczyną tego jest stosowanie wyjściowego tekstu publikacji angielskojęzycznych jako podstawy do przygotowania przedstawionej rozprawy. Tak jak wspomniałem, rozdział Materiały i metody zawiera wszystkie niezbędne informacje i wyczerpujące opisy metod natomiast forma ich przedstawienia nie jest najlepsza.

Rozdział czwarty „Wyniki” zawiera opis przeprowadzonych doświadczeń. Niestety i w tej części pracy pojawiają się problemy dotyczące warstwy językowej oraz edycyjnej. Trudno wszystkie mankamenty wymienić. Dziwne np. wydaje się stosowanie dwuzdaniowych tytułów rycin (patrz Ryc. 14, 18, 21). Dobrym zwyczajem, ułatwiającym lekturę, jest numeracja ścieżek prezentowanych żeli. Niestety w pracy tylko sporadycznie zastosowano numerowanie. Rycina 29 oraz Ryc. 30 według opisu przedstawiają frakcje uzyskane odpowiednio po oczyszczaniu białka na kolumnach Resorce Q oraz SP. Ryciny te jednak przedstawiają identyczne zdjęcia żeli i identyczne profile elucji. Wymaga to korekty chociaż w formie erraty. Białko nie może być: połączone z innym białkiem pod promotorem (patrz opis str. 71).

W pierwszej części rozdziału znajdują się wyniki eksperymentów *in vivo*. Doktorant opisuje efekty fenotypowe obserwowane w szczepach z nadprodukcją białek Rrp1, Rrp2 oraz Rad51. Do najważniejszych wyników należy zaliczyć obserwację spowolnienia wzrostu szczepów z nadprodukcją Rrp1 i Rrp2, kolokalizację tych białek z RPA, kolokalizację Rrp1 z Rad51 oraz Rrp1,2 zależną kompensację efektów fenotypowych wywoływanych przez nadprodukcję Rad51. To bardzo wartościowe wyniki wskazujące na możliwość powiązań aktywności analizowanych białek i współdziału białek Rrp1 i Rrp2 w procesach katalizowanych przez Rad51. W rycinie 11 można było zamieścić przykładowe obrazy przeprowadzonej analizy mikroskopowej. Rycina 12 mogła by zawierać obraz z wykorzystaniem kontrastu Nomarskiego co pozwoliło by określić kształt komórek i pozycję sygnału fluorescencyjnego. Ta sama uwaga dotyczy Ryciny 19A. Autor pisze o lokalizacji białka Rad 51 „w postaci włókna”. Czy chodzi o filament tworzony przez Rad51 na DNA? Proszę o

komentarz. Jak interpretować podwójny prążek Rad 51 uzyskany w analizie z przeciwciałami anty-Flag (patrz rycina 21 A).

W drugiej części rozdziału znajdujemy głównie, chociaż nie tylko, wyniki eksperymentów *in vitro*. Autor opisuje proces przygotowania wektorów ekspresyjnych do nadprodukcji białka Rrp1 oraz proces optymalizacji nadprodukcji i oczyszczania oraz sam proces oczyszczania preparatu Rrp1 wykorzystywanego w dalszych doświadczeniach. Zabrakło podania wydajności oczyszczania uzyskiwanych na poszczególnych etapach. Oczywiście jak wspomniałem powyżej ewidentny błąd wkradł się w danych zawartych w Rycinach 29 i 30. Nie zmienia to faktu, że cały proces prowadzący do oczyszczenia białka Rrp1 zakończył się sukcesem.

W kolejnych eksperymentach doktorant analizował aktywność ATPazy Rrp1 oraz wiązanie białka z ssDNA oraz dsDNA. Wydaje się, że na podstawie przedstawionych analiz oddziaływań trudno stwierdzić, że białko Rrp1 lepiej wiąże dsDNA. Proszę o komentarz. Bardzo dobra jest Ryc. 35 i dobry zamieszczony w tekście opis anizotropii jako metody do analizy kompleksów białek z DNA. Opis i rycina mogłyby zostać raczej umieszczone w rozdziale metody a opis mógłby trafić do podpisu pod ryciną.

Analizę oddziaływania białka Rrp1 oraz Rad51 przeprowadzono zarówno metodami *in vitro* jak i *in vivo*. Wydaje się, że na podstawie uzyskanych danych trudno kategorycznie stwierdzić, że Rrp1 tworzy kompleks z C-końcową częścią białka Rad51. Wykorzystywane do analizy białko posiadało delecję 113 N-terminalnych aminokwasów a całkowita liczba aminokwasów Rad51 to 365. Należałoby raczej stwierdzić, że Rrp1 nie wiąże N-terminalnego końca Rad51. Bardzo ciekawy wynik uzyskano analizując wpływ Rrp1 na kompleksy Rad51 tworzone na dsDNA. Autor wykazał, że białko Rrp1 usuwa Rad51 z dsDNA. W badaniach zastosowano eksperymenty typu EMSA oraz pomiary anizotropii. Dane są bardzo przekonujące i mają istotne znaczenie biologiczne. Mniej przekonujące są natomiast dane uzyskane z eksperymentów analizujących reakcję wymiany nici stymulowaną przez Rad51. Autor uzyskał tylko nieznaczne efekty. Czy doświadczenia były powtarzane a ich wyniki były zgodne?

W końcowej części rozdziału znajdują się opisy doświadczeń nad aktywnością białka Rrp1 jako ligazy ubikwityny. Badania przeprowadzono zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Autor wykazał, że Rrp1 jest ligazą ubikwitynową zdolną do ubikwitynacji białka Rad51.

W rozdziale Dyskusja doktorant w zwięzły sposób omawia uzyskane wyniki. Przedstawia model, w którym białko Rrp1 uczestniczy w usuwaniu Rad51 z dsDNA a ubikwitynacja Rad51 zapobiegała

ponownemu wiązaniu tego białka z DNA. Czy wiadomo coś o wpływie ubikwitynacji Rad51 na tworzenie kompleksów tego białka z DNA? Czy ubikwitynowana forma Rad51 tworzy filamenty nukleoproteinowe? Czy wykazana w pracy autoubikwitynacja Rrp1 wpływa na tworzenie kompleksów tego białka z DNA? W pracy autor lokalizuje Rrp1 w pobliżu RPA i ssDNA. Część analiz przeprowadzono w warunkach nadprodukcji Rad51 i Rrp1. We wcześniejszych, cytowanych przez autora pracach, białka te w stężeniach natywnych lokalizowane były głównie w pobliżu centromerów. Rodzi to pytanie o miejsce, w którym lokalizowana byłaby aktywność Rrp1 w normalnych warunkach wzrostu oraz podczas stresu. Gdzie i w jakich procesach będzie przejawiała się aktywność Rrp1? Bardzo proszę o komentarz.

Wniosek końcowy

Wyniki badań mgr Jakuba Muraszko poszerzają naszą wiedzę dotyczącą białek wpływających na stabilność genomów. Przedstawione do oceny badania mają znaczenie nie tylko dla poznania procesów w *S. pombe*, ale również przynoszą istotne informacje dla analiz i poznania mechanizmów zachodzących w komórkach organizmów wyższych. Stanowią wkład w rozwój dziedziny nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Doktorant wykazał umiejętność prowadzenia badań skomplikowanych procesów biologicznych, zastosował bogaty warsztat metod, przeprowadził odpowiednie kontrole a uzyskane wyniki zostały prawidłowo zinterpretowane. Przedstawiona praca posiada szereg mankamentów natury językowej i edycyjnej, jednak przedstawione w niej wyniki stanowią o jej dużej wartości naukowej. Praca spełnia kryteria stawiane dysertacjom doktorskim. W związku z powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pana mgr. Jakuba Muraszko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.