

Recenzja rozprawy doktorskiej pani **Anny Barg-Wojas** pt. „*Rola mediatorów homologicznej rekombinacji w utrzymaniu struktury centromerów u Schizosaccharomyces pombe*” przygotowanej pod opieką dr hab. Doroty Dziadkowiec.

Przedmiotem pracy było scharakteryzowanie funkcji białek Rrp1 i Rrp2, translokaz z rodziny SWI2/SNF2, i ich roli w utrzymaniu struktury chromatyny w regionie centromeru u drożdży rozszczepkowych (*Schizosaccharomyces pombe*, *S. pombe*). W związku z istnieniem szeregu podobieństw czynników regulujących strukturę chromatyny u drożdży *S. pombe* i u wyższych organizmów eukariotycznych, drożdże te są uznanym organizmem modelowym, zaś wyniki uzyskiwane w badaniach wykorzystujących ten model mają często istotne znaczenie dla poznania mechanizmów regulacji struktury chromatyny u ludzi. Model ten jest bardzo użyteczny między innymi dlatego, że proste doświadczenia z różnymi relatywnie łatwymi do uzyskania wariantami genetycznymi drożdży pozwalają wyjaśnić wiele zagadnień, których badania u wyższych organizmów eukariotycznych wymagałoby znacznie bardziej skomplikowanej metodologii badawczej. Przedmiot pracy jest oryginalny, a jej wyniki mają istotne znaczenie poznawcze, również w kontekście poznania mechanizmów funkcjonujących w komórkach ludzkich.

Rozprawa doktorska ma charakter zwięzłego druku o strukturze typowej dla tego typu prac. Praca liczy 142 numerowane strony, zawiera 60 rycin i 14 tabeli, a jej bibliografia odnosi się do 265 pozycji literaturowych. Wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej zostały również zawarte w manuskrypcie pracy naukowej: Barg-Wojas A, Schirmeisen K, Muraszko J, Kramarz K, Baranowska G, Carr AM, Dziadkowiec D: *S. pombe translocases Rrp1 and Rrp2 have distinct roles at centromeres and telomeres that ensure genome stability*, wysłanym do czasopisma *Journal of Cell Science*.

W rozdziale **Wstęp** Doktoranta zwięźle przedstawiła podstawowe informacje o szeregu zagadnień mających związek z przedmiotem pracy. Tematyka została zilustrowana 10 rycinami. Wstęp jest napisany poprawnym językiem, zawiera syntetycznie i czytelnie przedstawione informacje, stanowiąc dobry materiał do publikacji o charakterze przeglądu literatury. Po wstępie znajduje się **Cel Pracy**, w którym Doktorantka jasno określa główne zaplanowane cele projektu doktorskiego.

Istotnym elementem pracy jest rozdział **Materiały i Metody**. Mając na uwadze liczne metody badawcze i modele doświadczalne stosowane w pracy wymagana była taka organizacja tego rozdziału, aby zachować jego przejrzystość, rozsądną objętość oraz wystarczający stopień szczegółowości. Cel ten zasadniczo został osiągnięty, a wyjątkiem jest brak opisu metod statystycznych wykorzystanych w pracy (pozwoliłoby to na uproszczenie opisu rycin). Niestety, słabą stroną tej części pracy jest nadmierne stosowanie żargonu laboratoryjnego i

błędy językowe (można odnieść wrażenie, że tę część pracy ominęła korekta). Przykładem może być stosowanie terminu „stoki” zamiast „stężone roztwory wyjściowe”, „falkony” zamiast „próbówki produkowane przez firmę Falcon” (czy rzeczywiście takie były stosowane?), „hodowle logarytmiczne” zamiast „hodowli w logarytmicznej fazie wzrostu” czy „kolonijny PCR”. Natomiast bufor do nanoszenia próbek na żele SDS-PAGE, tzw. bufor Laemmli’ego, jest nazwany „buforem Lamli’ego” (str. 52) lub „buforem Laemli’ego” (str. 54), a co gorsza w różnych miejscach podany jest inny jego skład.

Rozdział **Wyniki** składa się wielu segmentów, a uzyskane przez Doktorantkę wyniki przedstawione są na 45 wielopanelowych rycinach. W części I (Rozdział 4.1) Doktorantka dokumentuje następujące wyniki:

- nadprodukcja Rrp2 i (w mniejszym stopniu) nadprodukcja Rrp1, ale nie brak Rrp1 czy Rrp2, spowalnia wzrost *S. pombe* oraz zwiększa ich wrażliwość na TBZ (czynnik destabilizujący strukturę mikrotubul); efekty nadprodukcji Rrp1 i Rrp2 były silniejsze w szczepach z wyjściowo zaburzoną strukturą chromatyny (mutanty  $\Delta swi6$  i  $\Delta clr4$ ) [podrozdział 4.1.4.],
- nadprodukcja Rrp1 i Rrp2 powoduje represję genów reporterowych zlokalizowanych w obszarze *imr* oraz *otr* centromeru (w mechanizmie niezależnym od Swi6 [podrozdział 4.1.2.],
- nie wykazano wpływu nadprodukcji Rrp1 i Rrp2 na ubikwitynację histonu H2B [podrozdział 4.1.3.],
- białka Rrp1 i Rrp2 wiążą się w komórce drożdży z centralnym obszarem centromeru (element *cnt*), a białko Rrp2 wykazuje również wiązanie z sekwencjami obecnymi w telomerze [podrozdział 4.1.4.],
- białko Rrp1 wiąże się z chromatyną w miejscach, w których wcześniej indukowano pęknięcia nici DNA [podrozdział 4.1.4.],
- cytotoksyczne efekty nadprodukcji Rrp1 są silniejsze w mutantach pozbawionych białka Rad52 (białko uczestniczące m.in. w rekombinacji homologicznej), natomiast brak Rad52 osłabia cytotoksyczne efekty nadprodukcji Rrp2.

W podsumowaniu tej części pracy doktorantka konkluduje, że białka Rrp1 i Rrp2 uczestniczą w utrzymaniu struktury rejonu centromerowego chromosomów.

Uwagi do tej części wyników:

- (a) wnioski o różnicach w działaniu Rrp1 i Rrp2 bazujące na subtelnych różnicach „optycznych” w tempie wzrostu kolonii powinny być wsparte ilościową prezentacją danych (z zastosowaniem odpowiednich testów statystycznych); bez tego bezpieczniej jest ograniczyć się do wnioskowania na podstawie bardziej wyraźnych różnic (uwaga ta dotyczy również wyników prezentowanych w kolejnych częściach pracy);

- (b) przedstawiona w podrozdziale 4.1.3. konkluzja o wpływie nadprodukcji Rrp1 i Rrp2 na generalne obniżenie poziomu białek histonowych w komórce jest zbyt silna jak na przedstawione dowody i powinna być wsparta wynikami dalszych badań - tym bardziej, że densytometrię membrany wybarwionej Ponceau S trudno uznać za wiarygodny test ilościowy,
- (c) dlaczego w pracy nie zawarto analizy wiązania białka Rrp2 w miejscach tworzenia pęknień nici DNA (analogicznej do analizy przedstawionej na Rycinie 28)?

W części II (Rozdział 4.2.) Doktorantka dokumentuje następujące wyniki:

- nadprodukcja Rrp1 i Rrp2 prowadzi do zwiększenia ilości skupisk Rad52 oraz zmiany proporcji  $\gamma$ H2A/H2A (zwiększenie względnej ilości formy ufosforylowanej),
- nadprodukcja Rrp1 i Rrp2 prowadzi do wydłużenia komórek *S. pombe*, a nadprodukcja Rrp2 również powstawanie komórek rozgałęzionych,
- nadprodukcja Rrp1 i Rrp2 prowadzi do zaburzeń struktury i segregacji materiału genetycznego.

W podsumowaniu tej części pracy doktorantka konkluduje, że białka Rrp1 i Rrp2 uczestniczą w replikacji i segregacji chromosomów.

W części III (Rozdział 4.3.) Doktorantka dokumentuje następujące wyniki:

- mutacje domeny translokazowej (SNF2\_N) oraz RING w białku Rrp1, oraz mutacje domen SNF2\_N, RING i SIM w białku Rrp2, zmniejszają wrażliwość na TBZ oraz zdolność represji transkrypcji genów reporterowych zlokalizowanych w rejonie centromeru w komórkach z nadprodukcją tych białek.

W podsumowaniu tej części pracy doktorantka konkluduje, że aktywność translokazowa i aktywność ligazy ubikwityny są istotne dla funkcji białek Rrp1 i Rrp2 jako czynników stabilizujących strukturę centromeru.

Uwagi do tej części wyników:

- (d) stwierdzenie „zwiększenie śmiertelności komórek obserwowane przy nadekspresji *rrp1+* jest zależne od jego aktywności translokazowej i ligazy ubikwityny” (Rys. 37A)” nie ma uzasadnienia w wynikach prezentowanych na rycinie 37A, która nie dokumentuje w przekonujący sposób różnic między wyjściową i zmutowanymi formami Rrp1;
- (e) rozważania na temat różnic w znaczeniu poszczególnych domen białek Rrp1 i Rrp2 dla utrzymania struktury centromeru, np. roli oddziałującej z SUMO domeny SIM białka Rrp2 (str. 88), wydają się w tym miejscu przedwczesne (wyniki przedstawione na Rycinie 38 są w tym kontekście niewystarczające).

W części IV (Rozdział 4.4.) Doktorantka dokumentuje następujące wyniki:

- efekty nadprodukcji białek Rrp1 i Rrp2 są podobne w szczepach pozbawionych endogennych genów *rrp2* i *rrp1*, a efekt cytotoksyczny obserwowany w komórkach z nadprodukcją obu białek jest podobny do efektu obserwowanego w komórkach z nadprodukcją Rrp2 (brak efektu synergistycznego czy addytywnego),
- nadprodukcja Rrp2 (ale nie Rrp1) zwiększa stopień sumoilacji białek (efekt nieobecny w przypadku mutacji domeny SIM), natomiast nagromadzenie sumoilowanych białek jest widoczne z komórek z nadprodukcją białka Rrp1 ze zmutowaną domeną ligazy ubiquityny [podrozdział 4.4.1.],
- białko Rrp2 wiąże się z sumoilowanymi białkami i samo może być sumoilowane [podrozdział 4.4.1.],
- nadprodukcja białek Rrp1 i (w mniejszym stopniu) Rrp2 zwiększa stopień (poli)ubikwitinacji białek w komórkach *S. pombe* [podrozdział 4.4.1.].

W podsumowaniu tej części pracy doktorantka konkluduje, że funkcje białek Rrp1 i Rrp2 w ochronie struktury centromeru mogą być związane z ich aktywnością ligaz ubiquityny oraz, w przypadku Rrp2, wpływie na sumoilację białek komórkowych.

Uwagi do tej części wyników:

- (f) prezentowana w oparciu o wyniki przedstawione na Rycinie 42 (np. na str. 93) konkluzja o tym, że białko Rrp2 jest sumoilowane, wydaje się w tym miejscu przedwczesna (należało raczej konsekwentnie „trzymać się” znaku zapytania w oznaczeniu adekwatnych prążków białkowych na tej rycinie);
- (g) w pracy brak jakiegokolwiek informacji o sposobie przeprowadzenia analizy proteomicznej, w tym o progach zastosowanych przy obliczeniowej identyfikacji białek. W związku z tym podanie wartości tzw. *Mascot Score* (Rycina 43B) nie jest wystarczające dla oceny wiarygodności wyniku identyfikacji białka; w tym celu niezbędne jest podanie informacji również o tzw. *PEP Score* oraz o dystrybucji *Mascot Score* w całym zestawie danych. Co do zasady, chociaż *Mascot Score* = 20 jest często stosowany jako próg odcięcia w rutynowych analizach, to wartości istotnie poniżej 100 nie świadczą o bardzo dużej wiarygodności wyniku identyfikacji.

W części V (Rozdział 4.5.) Doktorantka dokumentuje następujące wyniki:

- brak białek Rrp1 i Rrp2 zmniejsza wrażliwość szczepów *S. pombe* z mutacjami mającymi związek z ubiquitinacją histonu H2B (*htb1-K119R* i  $\Delta$ *rhpf6*) na promieniowanie UV i hydroksymocznik (czyli czynniki indukujące między innymi stres replikacyjny) [podrozdział 4.5.1.],
- białko Rrp1 (niezależnie od białka Rrp2), ale nie białko Rrp2, oddziałuje z białkiem PCNA (formami wyjściową i diubikwitinowaną), a w komórkach z nadprodukcją Rrp1 maleje udział nie ubiquitinowanej formy PCNA [podrozdział 4.5.2.],

- jednoczesne usunięcie domen odpowiedzialnych za interakcje z ubikwityną (MIU) i PCNA (PIM) eliminuje zwiększoną cytotoksyczność i zaburzenia cyklu komórkowego wynikające z nadprodukcji białka Rrp1, a motyw PIM jest niezbędny dla zachowania oddziaływań między Rrp1 i PCNA [podrozdział 4.5.3.],
- usunięcie domeny PIM niweluje zdolność nad-produkowanego białka Rrp1 do zmniejszenia poziomu nie ubikwitynowanej i zwiększenia udziału ubikwitynowanej formy PCNA [podrozdział 4.5.4.],
- zmiana proporcji ubikwitynowanej i nie ubikwitynowanej formy PCNA w komórkach z nadprodukcją Rrp1 oraz zdolność wiązania Rrp1 z oboma formami PCNA jest niezależna od obecności ligaz E3 Rad8 i Rhp18 (wcześniej znanymi ligazami ubikwityny uczestniczącymi w modyfikacji PCNA) [podrozdział 4.5.4.].

W podsumowaniu tej części pracy doktorantka konkluduje, że Rrp1 uczestniczy w ubikwitynacji PCNA, co może być podłożem obserwowanego wpływu Rrp1 na procesy regulowane przez białko PCNA (np. odpowiedź na stres replikacyjny).

Uwagi do tej części wyników:

- (h) sformułowanie „ratuje wrażliwość” (str. 97) jest dość niefortunne i może znaczyć, że wrażliwość jest niezmienną pomimo obecności innych czynników wywołujących oporność; w tym przypadku chodzi jednak o zmniejszoną wrażliwość;
- (i) czy konkluzja „Rrp1 fizycznie oddziałuje z PCNA niezależnie od Rrp2” (str. 111) jest uzasadniona w prezentowanych wynikach? Doświadczenia, które dotyczą tej kwestii (przedstawione na Rys. 48 i Rys. 49) wskazują przecież na niższy poziom PCNA związanego z Rrp1 w komórkach pozbawionych Rrp2.

Wszystkie doświadczenia, których rezultaty przedstawiono w części **Wyniki** zostały poprawnie zaplanowane i zrealizowane. Pewne zastrzeżenia budzi jedynie pojawiająca się w niektórych miejscach nadmierna „odwaga” Doktorantki w interpretacji wyników (np. w tytułach niektórych podrozdziałów czy rycin). W mojej opinii Doktorantka powinna zwrócić większą uwagę na oddzielenie tego co jest rzeczywistym wynikiem doświadczenia od tego co jest jego interpretacją (często nie jedynie możliwą).

W rozdziale **Dyskusja** Doktorantka w syntetyczny sposób podsumowuje wyniki uzyskane w doświadczalnej części pracy oraz kompetentnie dyskutuje je w kontekście dostępnych danych literaturowych. Na uwagę zwraca to, że w tej części pracy poprawnie zostały rozdzielone znaczeniowo rzeczywiste wyniki doświadczalne oraz ich interpretacja przez eksperymentatora. Co istotne, dyskusja zawiera racjonalnie uzasadnione kierunki dalszych badań, które umożliwią potwierdzenie i rozszerzenie wiedzy uzyskanej w projekcie doktorskim. Ta część pracy napisana jest czytelnie poprawnym językiem.

Rozprawa podsumowana jest klarownie sformułowanymi **Wnioskami**, które odzwierciedlają uzyskane wyniki, i uzupełniona poprawnym **Streszczeniem** w języku polskim i angielskim.

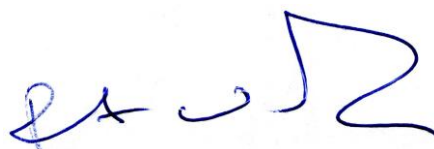
### **Podsumowanie.**

Recenzowana praca doktorska dotyczy ciekawego zagadnienia o dużej wartości poznawczej. Praca jest dobrze zaplanowana i kompetentnie zrealizowana. Doktorantka wykazała się umiejętnościami praktycznymi pozwalającymi na uzyskanie oryginalnych wyników. Praca z całą pewnością „stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.” Niezależnie od uwag krytycznych zawartych w recenzji przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską pani Anny Barg-Wojas oceniam jednoznacznie pozytywnie.

### **Wniosek końcowy:**

W mojej opinii przedstawiona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.).

W związku z tym wnoszę do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o kontynuowanie postępowania o nadanie pani Annie Barg-Wojas stopnia doktora.



prof. dr hab. Piotr Widłak  
Centrum Onkologii - Instytut, Gliwice

16 września 2019