



dr hab. Anna Kurlandzka
Zakład Genetyki
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

Warszawa, 10 marca 2020

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Tomasza Bąkowskiego "Rola translokazy DNA
Irc5 w metabolizmie DNA u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*"**

Przedstawiona do oceny praca została wykonana w Zakładzie Genetyki i Fizjologii Komórki Instytutu Biologii Eksperymentalnej na Wydziale Biologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Robert Wysocki, zaś promotorem pomocniczym – dr Ireneusz Litwin.

Rozprawa dotyczy doprecyzowania funkcji drożdżowego białka Irc5, o którym wiadomo, że należy do grupy translokaz DNA istotnych dla funkcjonowania komórek eukariotycznych. Wiedzano też, że białko to jest zachowane w ewolucji, zaś mutacje w genie je kodującym prowadzą do poważnych chorób u ludzi. Ponieważ translokazy DNA są bardzo ważne dla zachowania stabilności genomu, każda ich nowa charakterystyka jest cennym wkładem w naukę.

Celem pracy było pozornie proste sprawdzenie, czy białko Irc5 bierze udział w odpowiedzi komórki na uszkodzenia DNA jednak okazało się, że Doktorant stanął przed niezwykle złożonym zadaniem. Na podstawie literatury i kolejno wykonywanych eksperymentów zorientował się, że pracuje *de facto* nad zagadnieniem dotyczącym co najmniej trzech niezwykle skomplikowanych procesów: replikacji DNA, naprawy jego uszkodzeń w powiązaniu z remodelowaniem chromatyny oraz związanej z tymi procesami kohezji chromatyd siostrzanych. Powiązanie ze sobą i rozwikłanie tych wątków w ramach jednego doktoratu to było naprawdę trudne zadanie.

W efekcie badań przeprowadzonych przez mgr. Bąkowskiego oraz dodatkowych doświadczeń wykonanych przez innych członków zespołu, w którym pracował, wyciągnięto wnioski, iż w gruncie rzeczy główną funkcją białka Irc5 jest udział w kohezji chromatyd siostrzanych. Należy jednak zdawać sobie sprawę, że wbrew skłonnościom ludzkiego umysłu do analizy i porządkowania – procesy biologiczne nie są rozdzielne, wzajemnie się zająbiają i uzupełniają. Dlatego też nie należy usilnie starać się o przypisanie danego elementu do

konkretnego, opisanego już zjawiska. Sądzę, że raczej trzeba pogodzić się z pokorą z tym, że lepiej scharakteryzowano element kilku złożonych, nie do końca poznanych procesów. Badania mgr. Bąkowskiego przyczyniły się w znaczącym stopniu do powstania dwóch cennych artykułów dołączonych jako załączniki do niniejszej rozprawy doktorskiej.

Ocena sposobu przedstawienia pracy

Wstęp wprowadza czytelnika w bardzo złożone zagadnienia związane z replikacją i naprawą DNA, z kohezją chromatyd siostrzanych oraz remodelowaniem chromatyny. Muszę podkreślić, że Doktorant wyjątkowo zręcznie przedstawił te skomplikowane procesy na 28 stronach i sprawił, że miałam wrażenie jasności a nie chaosu. Omówił precyzyjnie te zagadnienia, które były niezbędne dla dalszego studiowania rozprawy i odniósł się do bogatej literatury przedmiotu.

Cel pracy, jak już wspomniałam, sformułowano ogólnie i oszczędnie. Dodano cele szczegółowe, na których miał skupić się Doktorant.

Materialy i metody zostały omówione w sposób nieco naiwny i zbyt szczegółowy. Zwłaszcza wielokrotne podkreślanie stosowania wody MiliQ jest trochę irytujące. Jeśli jest to krytyczne, to można podać niezbędne maksymalne przewodnictwo wody używanej w doświadczeniach. Zastanowiło mnie też w opisie metody endogennego cięcia chromatyny stwierdzenie, że azydek sodu zatrzymuje metabolizm komórkowy. Może metabolizm oddechowy istotnie jest wyłączony, ale procesy z udziałem energii z procesów fermentacji (pożywka YPD) już niekoniecznie. Te i inne niewielkie niedoskonałości nie przeszkadzają jednak w zrozumieniu sposobu postępowania.

Wyniki są opisane starannie i przejrzysto. Rozdziały od 4.2 do 4.4 dotyczą wykazania udziału Irc5 w replikacji i naprawie DNA. Na kilka sposobów pokazano, że istotnie białko to jest w sposób wyraźny zaangażowane w oba te procesy. Zastanawia mnie jednak duży zakres stężeń MMS stosowanych w testach wzrostowych pojedynczych i podwójnych mutantów użytych do badań. Testy te są krytyczne w przypisaniu funkcji komórkowej białka Irc5. Fenotyp wrażliwości mutantu *irc5Δ-1* na MMS jest niezbyt silny, widać go najlepiej na pożywce minimalnej, przy stężeniu MMS 0,013%. W większości testów używano jednak stężeń znacznie niższych (nawet około 100 razy) oraz pożywki pełnej, przeważnie powodującej zwiększoną tolerancję komórek na obecność mutagenu. W tych warunkach fenotyp mutantu raczej nie miał szans się przejawiać. W związku z tym nie jestem

do końca przekonana do wniosków wyciągniętych na podstawie tych doświadczeń w Rozdziale 4.4. Rozdział 4.5 dotyczy roli Irc5 w kohezji chromatyd siostrzanych. Tutaj mgr Bąkowski przeprowadził klasyczne testy i stwierdził stosunkowo niewielki defekt kohezji chromatyd dotyczący 17% komórek. Ustalił też, że do prawidłowego funkcjonowania białka Irc5 niezbędna jest jego domena ATPazowa. Z własnego doświadczenia wiem, że praca ze szczepami mającymi zaburzoną stabilność genomu jest niewdzięczna. Defekty są bardzo szybko kompensowane przez liczne redundantne mechanizmy naprawcze. Dlatego też jest całkiem prawdopodobne, że w gruncie rzeczy defekt segregacji dotyczy znacznie większej liczby, a może nawet wszystkich komórek. Niestety, trudno to udowodnić.

W kolejnych doświadczeniach Doktorant sprawdził metodami genetycznymi, które dobrze scharakteryzowane geny zaangażowane we wstępne etapy kohezji wchodzi w interakcje z IRC5. Skonstruował podwójne mutanty niosące mutacje w powyższych genach oraz delecję *IRC5* oraz przeprowadził testy wzrostowe podwójnych mutantów. Ponadto sprawdził (metodą immunoprecypitacji chromatyny), że brak Irc5 obniża o około 1/3 poziom kohezyny w wybranych rejonach. Rozdział 4.6.2 jest napisany w sposób dość niejasny, ale zorientowałam się, że chodziło o sprawdzenie, czy Irc5 ma udział w akumulacji kohezyn w okolicy zatrzymanych widełek replikacyjnych. Potwierdzono, że istotnie ma to miejsce. Rozdział 4.6.3 opisujący interakcje Irc5 z białkiem Scc2, niezbędnym do ładowania kohezyjny, wydał mi się najbardziej przekonujący. Wyraźnie wykazano te interakcje metodami genetycznymi i poparto je wynikami dotyczącymi interakcji z drugim białkiem uczestniczącym w ładowaniu kompleksów kohezyjnych na chromatynę (Chl1). To wskazuje na udział Irc5 w ładowaniu kohezyjny.

Dyskusja w części zawiera powtórzenie informacji ze wstępu lub wyników, ale poza tym jest bardzo ciekawa, zwłaszcza, że omówiono inne doświadczenia wykonane w zespole Doktoranta, które potwierdziły i uzupełniły jego wnioski. Potwierdzono słuszność przypuszczenia, że Irc5 jest potrzebne do ukończenia replikacji alkilowanego DNA po traktowaniu MMS. Sprawdzone również, że białko to nie bierze udziału w końcowych etapach, ale w reperacji DNA z przełączaniem matrycy oraz ułatwia tolerancję uszkodzeń DNA. Nie jestem na tyle kompetentna, aby w pełni docenić szczegóły dywagacji Doktoranta na temat mechanizmów replikacji i naprawy DNA, ale jego wiedza na ten temat i swoboda poruszania się w tej złożonej materii jest imponująca. Nieco lepiej orientuję się w zagadnieniach związanych z kohezją chromatyd. Tu mgr Bąkowski skłania się do stwierdzenia, że Irc5 przyczynia się do kohezji chromatyd siostrzanych na etapie ładowania

kohezyn na DNA. Proponuje również następne posunięcia, które mogłyby to przypuszczenie udowodnić. Proponuje też model działania Irc5. Jak rozumiem, model ten zakłada angażowanie się Irc5 w trzy różne procesy w zależności od stanu fizjologicznego komórki (stres replikacyjny lub normalne funkcjonowanie). Możliwe, że do tego celu potrzebne są różne pule badanego białka lub jego modyfikacje. Doktorant zastanawia się też nad mechanizmem ładowania kohezyn przez Irc5 i skłania się do przypuszczenia, że może ono pełnić funkcję zbliżoną do kompleksu remodelującego chromatynę RSC. Zatem, Irc5 również uczestniczyłoby w udostępnianiu DNA, jak też w przyłączeniu kompleksu ładującego Scc2-Scc4. Ze względu na złożoność zagadnienia i, w gruncie rzeczy, brak wygodnych metod doświadczalnych, pełne wyjaśnienie sposobu działania Irc5 zapewne jeszcze musi poczekać.

Podsumowując, uważam, że mgr Tomasz Bąkowski wykonał bardzo ciekawe badania, które kompetentnie opisał w przedstawionej rozprawie. Nie mam do rozprawy żadnych poważnych zastrzeżeń, niewielkie uwagi krytyczne już wyraziłam powyżej, zaś drobne potknięcia pisarskie są w praktyce nieuniknione. Ogromna większość wyników opisanych w rozprawie została zamieszczona w dwóch załączonych publikacjach w prestiżowych czasopismach Nucleic Acids Research oraz The EMBO Journal. Stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca spełnia wszystkie wymogi ustawowe stawiane pracom doktorskim i występuję do Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie jej autora, mgr Tomasza Bąkowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wysoką wartość uzyskanych wyników i ich opublikowanie w bardzo dobrych czasopismach wnioskuję o wyróżnienie niniejszej rozprawy.



dr hab. Anna Kurlandzka