



Dr hab. Maciej Wnuk, Profesor UR  
Katedra Biotechnologii  
Kolegium Nauk Przyrodniczych  
Uniwersytet Rzeszowski

**Recenzja rozprawy doktorskiej**

**mgr. Tomasza Bąkowskiego**

**pod tytułem**

**„Rola translokazy DNA Irc5 w metabolizmie DNA u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*”**

Przetawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr. Tomasza Bąkowskiego została wykonana pod kierunkiem Pana Profesora dr hab. Roberta Wysockiego oraz pod opieką promotora pomocniczego Pana dr. Ireneusza Litwina w Zakładzie Genetyki i Fizjologii Komórki Instytutu Biologii Eksperymentalnej Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego.

Była ona realizowana w ramach projektu naukowego NCN Sonata, którego kierownikiem był promotor pomocniczy Pan dr Ireneusz Litwin.

Wyniki przedstawione w dysertacji zostały opublikowane w 2017 roku w czasopiśmie *Nucleic Acids Research* w artykule zatytułowanym „The LSH/HELLS homolog Irc5 contributes to cohesin association with chromatin in yeast” oraz 2018 roku w czasopiśmie *EMBO Journal* w artykule zatytułowanym „Error-free DNA damage tolerance pathway is facilitated by the Irc5 translocase through cohesin”. W obu artykułach mgr Bąkowski jest drugim autorem. Należy podkreślić, że oba w/w czasopisma należą do grupy wiodących czasopism w dyscyplinie nauki biologiczne. Dodatkowo wyniki zaprezentowane w rozprawie doktorskiej były także prezentowane na trzech konferencjach.

Problematyka pracy doktorskiej dotyczy poznania molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymanie stabilności genetycznej drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, związanych z aktywnością zależnej od ATP translokazy DNA Irc5. Praca doktorska w szczególności koncentruje się na poznaniu znaczenia fizjologicznej roli białka Irc5 podczas stresu replikacyjnego.

Translokazy DNA należące do rodziny SWI2/SNF2 stanowią liczną grupę białek zaangażowanych m.in., w regulację transkrypcji oraz replikacji, a także proces rekombinacji

chromosomów, odpowiedź na uszkodzenia DNA oraz naprawę podwójnych pęknięć DNA. Dlatego dokładna charakterystyka funkcjonalna tychże białek jest niezwykle ważna dla zrozumienia podłoża molekularnego wyżej wspomnianych procesów, a problematyka pracy doktorskiej mimo, iż ma charakter badań podstawowych oraz modelowych ma duży potencjał translacyjny i istotnie poszerza dotychczasową wiedzę na temat regulacji procesu replikacji oraz naprawy DNA organizmów eukariotycznych, w tym komórek człowieka. Należy zaznaczyć, iż badania wykonane przez doktoranta są także uzasadnione zważywszy na fakt niewielkiej ilości danych eksperymentalnych dotyczących funkcji Icr5. Tematyka pracy wpisuje się tym samym w nurt badań integrujących wiedzę z zakresu biologii molekularnej oraz fizjologii organizmów eukariotycznych.

Rozprawa doktorska mgr Tomasza Bąkowskiego liczy 110 numerowanych stron oraz dodatkowo zawiera dwa załączone manuskrypty artykułów naukowych, w których zawarte są wyniki przedstawione w rozprawie. Układ pracy doktorskiej jest typowy dla tego typu prac. Praca doktorska została podzielona na następujące rozdziały: 1. Wstęp, 2. Cel Pracy, 3. Materiały i Metody, 4. Wyniki, 5. Dyskusja, 6. Bibliografia, 7. Wykaz skrótów, 8. Załączniki. Tekst pracy poprzedzony jest spisem treści, wykazami zastosowanych skrótów oraz streszczeniami w języku polskim, jak również angielskim. W pracy zabrakło jednak wyodrębnionego rozdziału podsumowującego otrzymane wyniki w postaci wniosków końcowych. Bibliografia obejmuje 315 pozycji literaturowych. Praca doktorska zawiera 48 rycin i 5 tabel.

Wstęp stanowią logicznie powiązane podrozdziały wprowadzające czytelnika w zagadnienia poruszane w rozprawie doktorskiej. W oparciu o adekwatną do tematyki literaturę doktorant dokonał opisu aktualnego stanu wiedzy dotyczącego m.in. komórkowej odpowiedzi na uszkodzenia DNA, molekularnego podłoża stresu replikacyjnego, struktury i roli kohezyn w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA oraz stresu replikacyjnego, a także funkcji białek należących do rodziny SNF2. Rozdział ten został dodatkowo wzbogacony w liczne schematy zaczerpnięte z tekstów źródłowych obrazujących omawiane zagadnienia, a także tabelę zestawiającą syntetycznie aktualną wiedzę na temat translokaz DNA należących do rodziny SWI2/SNF2. Doktorant we Wstępie umiejętnie wykazał także niedostatki w dotychczasowej wiedzy dotyczącej białek Icr5, które tym samym stanowiły przyczynek do podjęcia przez Niego przedmiotowych badań.

Cel pracy doktorskiej został określony w sposób jednoznaczny zgodnie z tematem rozprawy. Dodatkowo doktorant sprecyzował cztery cele szczegółowe, które posłużyły doktorantowi w osiągnięciu celu głównego, tj. udzielenie odpowiedzi na pytanie czy białko Irc5 bierze udział w odpowiedzi komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* na uszkodzenia DNA.

Rozdział zatytułowany Materiały i metody zawiera tabularyczny opis wykorzystanych szczepów *Saccharomyces cerevisiae*, szczepów bakteryjnych, szczepów drożdżowych, użytych plazmidów oraz starterów. W rozdziale tym opisano wszystkie procedury eksperymentalne wykorzystane do weryfikacji hipotezy badawczej. W rozdziale Materiały i metody zawarto m.in., opis: warunków hodowli bakterii oraz drożdży, testów płytkowych wrażliwości drożdży *Saccharomyces cerevisiae* na związki genotoksyczne, testów przeżywalności podczas ekspozycji na MMS w podłożu płynnym, krzyżowania szczepów drożdży, sporulacji oraz analizy tetrad, synchronizacji komórek drożdży w fazie G1, synchronizacji komórek drożdży w fazie G2/M, analizy cyklu komórkowego komórek drożdży metodą cytometrii przepływowej, wysokowydajnej transformacji drożdży, procedury izolacji genomowego DNA z komórek drożdży, konstrukcji mutantów delecyjnych drożdży z wykorzystaniem PCR, warunków PCR, procedury qPCR, mutagenyzy, procedury immunoprecipitacji chromatyny, testów sprawdzających kohezję chromatyd siostrzanych, procedury obserwacji mikroskopowej skupisk białka Rad52-YFP w jądrach komórek drożdży, testów endogennego cięcia chromatyny, izolacji białek z komórek drożdży w warunkach denaturujących, procedury elektroforezy białek i analiz Western Blot, procedury transformacji bakterii *E. coli* i izolacji plazmidowego DNA.

Drobnym mankamentem w/w opisanej sekcji jest brak informacji o stężeniu/rozcieńczeniu przeciwciał użytych w eksperymentach przez doktoranta, brak informacji o stosowanych przeciwciałach drugorzędowych, a także programów statystycznych stosowanych podczas analizy danych ilościowych.

Niezależnie od powyższego, jakość merytoryczna oraz ilość zastosowanych technik oraz narzędzi eksperymentalnych świadczy o bardzo dobrym warsztacie Doktoranta.

Prezentacja wyników została usystematyzowana w sposób tworzący logiczny ciąg zmierzający do udzielenia odpowiedzi na zdefiniowane w pracy doktorskiej cele. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż wyniki zostały przedstawione na bardzo dobrze opracowanych rycinach dokumentujących poszczególne etapy eksperymentów oraz realizowanej pracy

doktorskiej. Do najważniejszych wyników zaprezentowanych w tej części pracy należy uznać:

- Wykazanie, iż komórki z delecją genu *IRC5* oraz obniżoną ekspresją genu *RSC8* charakteryzują się zwiększoną wrażliwością na kamptotecynę, fleomycynę i hydroksymocznik oraz metanosulfonian metylu, natomiast komórki z częściową delecją genu *IRC5* oraz niezmienioną ekspresją *RSC8* odznaczają się ograniczoną wrażliwością na związki genotoksyczne.
- Stwierdzenie, iż aktywność ATP-azowa jest niezbędna dla funkcji białka Irc5 podczas ekspozycji komórek na metanosulfonian metylu (MMS).
- Wykazanie, iż aktywacja punktu kontrolnego fazy S przez MMS jest niezaburzona w komórkach pozbawionych białka Irc5.
- Zaobserwowanie w komórkach pozbawionych funkcjonalnego białka Irc5 zwiększonego poziomu replikacyjnych uszkodzeń DNA indukowanych przez MMS.
- Wykazanie, iż białko Irc5 zaangażowane jest w naprawę DNA z udziałem helikazy i topoizomerazy Sgs1-Top3-Rmi1 oraz niezależne od nukleazy Mus81-Mms2 i helikazy Srs2.
- Wykazanie, iż gen *IRC5* jest epistatyczny względem genów *RAD5* i *RAD18*.
- Stwierdzenie, iż brak białka Irc5 powoduje zwiększoną częstość przedwczesnej separacji chromatyd siostrzanych, a aktywność ATPazowa białka Irc5 jest istotna dla kohezji chromatyd siostrzanych.
- Wykazanie, iż aktywność białka Irc5 determinuje ilość kohezyn w chromatynie oraz ich lokalizację w pobliżu zatrzymanych widełek replikacyjnych.

Wyniki Doktoranta tym samym wskazują, iż inaktywacja genu *IRC5* prowadzi do szeregu poważnych zaburzeń związanych z naprawą DNA oraz odpowiedzią komórek drożdży na stres replikacyjny.

Dyskusja została opracowana w sposób wyczerpujący w oparciu o adekwatną do problematyki literaturę. Rozdział ten czyta się z przyjemnością, gdyż wskazuje on na bardzo dobrą znajomość przez Doktoranta problematyki dotyczącej mechanizmów molekularnych leżących u podłoża niestabilności genetycznej związanej ze stresem replikacyjnym. Bezspornym walorem dyskusji jest w mojej ocenie umiejętność krytycznego odniesienia się do części uzyskanych wyników świadcząca o dojrzałości naukowej Pana mgr Bąkowskiego. W dyskusji w oparciu o literaturę oraz otrzymane wyniki Doktorant sformułował także przyszłe możliwe

kierunki badawcze dotyczące m.in., mechanizmów odpowiedzialnych za interakcję kohezyn z DNA przy udziale Icr5 czy przeprowadzenia porównawczych badań dotyczących ludzkiego genu *LSH*, który jest domniemanym homologiem drożdżowego genu *ICR5*. Za bardzo pozytywny element dyskusji uważam jej wzbogacenie w schemat podsumowujący najważniejsze odkrycia dokonane przez Doktoranta (Ryc. 5.5).

Natomiast, za nie do końca uprawione uważam, prezentowane w dyskusji Ryciny 5.1-5.4 przedstawiające wyniki według przypisu zawartego pod rysunkiem autorstwa Promotora Pomocniczego i innych współautorów publikacji prezentowanych w suplemencie doktoratu. Tego typu wyniki, nawet jeśli są tylko prezentowane w celu uzupełnienia czy potwierdzenia hipotezy zawartej w doktoracie, nie powinny być zamieszczane w dyskusji, gdyż nie były one otrzymane przez Doktoranta i wprowadzają czytelnika w przekonanie, iż podczas weryfikacji hipotezy badawczej powinny te eksperymenty także zostać wykonane samodzielnie przez Doktoranta.

Niezależnie od powyższego, recenzent bardzo wysoko ocenia jakość pracy doktorskiej. Otrzymane wyniki bezsprzecznie są bardzo wartościowymi danymi dla nauki i istotnie poszerzają dotychczasową wiedzę w dyscyplinie nauki biologiczne. Niemniej jednak, wobec braku istotnych uwag krytycznych chciałbym poprosić Doktoranta o odniesienie się do kilku kwestii, które nasunęły się recenzentowi w trakcie czytania dysertacji:

1. Czy Doktorant mógłby szerzej uzasadnić twierdzenie ze str. 53, iż mutant *irc5-Δ1* nie jest wrażliwy na kamptotecynę, fleomycynę i hydroksymocznik. Według Ryciny 4.7 mutant *irc5-Δ1* jest wrażliwy na te wszystkie związki w odniesieniu do warunków kontrolnych. Zdaniem recenzenta Rycina 4.7 wskazuje, iż nie ma natomiast różnic we wrażliwości mutantu *irc5-Δ1* względem szczepu dzikiego w obecności kamptotecyny i hydroksymocznika. Według recenzenta Rycina 4.7 wskazuje również, iż mutant *irc5-Δ1* jest także bardziej wrażliwy na fleomycynę w odniesieniu do szczepu dzikiego. Jakże były powody wykluczenia tego związku z dalszych analiz?
2. Na jakiej podstawie dokonano wyboru stężeń związków jako induktorów genotoksyczności, np. IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>75</sub>?
3. Czy istniał jakiś specjalny powód dla czego Doktorat wybrał do analiz wyłącznie kamptotecynę, fleomycynę, hydroksymocznik oraz metanosulfonian metylu pomijając inne znane induktory stresu replikacyjnego w komórkach eukariotycznych np. afidikolinę, etopozyd, cisplatynę czy doksorubicynę?
4. Czy doktorat może określić czy użyte w testach skринingowych związki w zastosowanych dawkach indukują cytotoxycznosc czy raczej działają jako cytostatyki? Według



recenzenta Rycina 4.8 nie informuje o przeżywalności komórek drożdży jak opisuje doktorant, a o zdolności komórek do podjęcia podziałów komórek. Doktorant musi pamiętać, że wśród wysianych na podłoże komórek mogą być komórki martwe, ale również żywe z zatrzymanym podziałem komórkowym.

5. Czy doktorant mógłby odnieść się krytycznie do uzyskanych przez siebie wyników w świetle pracy autorów Kitanovic A i in., opublikowanej w *FEMS Yeast Research*, 2009, 535–551 dotyczących możliwości obniżania poziomu ATP przez MMS? Czy obniżenie puli ATP w komórkach pozbawionych genu *ICR5* może mieć dodatkowe znaczenie dla obserwowanego poziomu uszkodzeń DNA, stresu replikacyjnego lub/oraz procesu kohezji chromatyd siostrzanych?
6. Doktorant wykazał m.in., wzrost jednoniciowych przerw na skutek działania MMS, jak również zaburzenia w kohezji chromatyd siostrzanych w komórkach pozbawionych funkcjonalnego genu *ICR5*. W związku z tym czy brak funkcjonalnego genu *ICR5* może prowadzić do chromosomowej heterogenizacji populacji komórek? Jeśli tak, to jakiego typu aberracji chromosomowych należałoby się spodziewać w komórkach? Czy wg Doktoranta brak funkcjonalnego genu *ICR5* może również prowadzić do eliminowania z populacji części komórek z niezrównoważeniami chromosomowymi? Które wyniki na to mogą wskazywać?
7. W dyskusji Doktorant stwierdza, że defekt w kohezji w komórkach *irc5-Δ1* prowadzi do niestabilności rDNA. Twierdzenie swoje opiera na wyniku współautorów, który istotnie wskazuje na występowanie krótszych fragmentów rDNA u trzech mutantów *irc5-Δ1* w porównaniu do szczepu dzikiego. Niemniej w przypadku występowania niestabilności rDNA można byłoby się spodziewać znacznie większej zmienności w obrębie frakcji rDNA. Jak doktorant mógłby wytłumaczyć występowanie niemal identycznych frakcji wielkości rDNA u trzech mutantów *irc5-Δ1*?

### **Wniosek końcowy**

W podsumowaniu recenzji, chciałbym stwierdzić, iż mimo moich licznych pytań, bardzo wysoko oceniam przedstawioną pracę doktorską Pana mgr. Tomasza Bąkowskiego oraz stwierdzam, że spełnia ona wymogi określone w art. 13.1 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. zmianami). Wniosuję do Rady Naukowej Wydziału Nauk



Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pana mgr. Tomasza Bąkowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość naukową wyników, które zostały już opublikowane z współautorstwem Pana mgr. Tomasza Bąkowskiego w czasopiśmie EMBO Journal oraz Nucleic Acids Research, wnioskuję do Rady Naukowej Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o wyróżnienie ocenianej przeze mnie rozprawy doktorskiej.

Rzeszów, 01/03/2020

Dr hab. Maciej Wnuk, prof. UR

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Maciej Wnuk', is written over the typed name.