



Wrocław, 17.02.2021

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani Aleksandry Sobolewskiej

pt. „**Regulacja polimeraz DNA z rodziny Y, zdolnych do syntezy poprzez uszkodzenia matrycy, w cyklu komórkowym *Saccharomyces cerevisiae***”

przygotowanej pod opieką

prof. dr hab. Ewy Śledziewskiej-Gójskiej i dr Justyny McIntyre

Wcześniejsze badania sugerowały, że fizjologiczna rola polimeraz Pol eta i Rev1 w spontanicznej mutagenzie w nieuszkodzonych komórkach jest związana z fazą G2/M, gdyż w tej fazie obserwowano akumulację białka dla obu polimeraz. Przedmiotem pracy było scharakteryzowanie regulacji polimeraz Pol eta i Rev1 w cyklu komórkowym w odpowiedzi na egzogenne uszkodzenia DNA.

Przedmiot pracy jest oryginalny, a jej wyniki mają istotne znaczenie poznawcze, zwłaszcza że dane uzyskiwane w badaniach wykorzystujących drożdże *S. cerevisiae* jako modelowy organizm często pozwalają na zrozumienie procesów związanych z metabolizmem DNA u ludzi.

Oceniana rozprawa doktorska ma typowy układ i składa się ze streszczenia w języku polskim i angielskim, wstępu, opisu celu pracy, materiałów i metod, oraz wyników, dyskusji, podsumowania oraz bibliografii. Wyniki przedstawione w pracy zostały niedawno opublikowane: A. Sobolewska, A. Halas, M. Plachta, J. McIntyre, E. Śledziewska-Gójska (2020): „Regulation of the abundance of Y-family polymerases in the cell cycle of budding yeast in response to DNA damage”, *Current Genetics* 66(4):749-763. doi: 10.1007/s00294-020-01061-3.

We **Wstępie** Doktoranta skrótowo przedstawia źródła uszkodzeń DNA i mechanizmy, dzięki którym są one naprawiane. Następnie omawia punkty kontroli cyklu komórkowego i systemy tolerancji uszkodzeń DNA, ze szczególnym uwzględnieniem roli modyfikacji PCNA w wyborze ścieżki uruchomienia zatrzymanych widełek replikacyjnych. W części tej znalazły się ogólne

i przez to nieprecyzyjne sformułowania. Doktorantka pisze bez żadnego dodatkowego komentarza, że naprawa podwójnych pęknięć w DNA na drodze homologicznej rekombinacji jest bezbłędna i wykorzystywana głównie u bakterii i niższych eukariontów, natomiast w komórkach ssaczych dominuje drugi sposób, niehomologiczne łączenie końców, często prowadzący do powstawania delecji. Podobne stwierdzenie dotyczy ścieżek uruchomienia zatrzymanych widełek replikacyjnych: wierny mechanizm, zamiana matrycy, wykorzystywany jest przez drożdże, natomiast w komórkach ssaczych dominuje mutagenna ścieżka, synteza przez uszkodzenie (TLS). Wydaje się nielogiczne, by u wyżej uorganizowanych organizmów faworyzowane były mniej wierne mechanizmy naprawy DNA.

Główną część **Wstępu** stanowi opis jednej ścieżki tolerancji uszkodzeń, syntezy poprzez uszkodzenie oraz charakterystyka dwóch polimeraz, Pol eta i Rev1, które uczestniczą w tym procesie u *S. cerevisiae*. Znajdują się tu podstawowe informacje mające bezpośredni związek z przedmiotem pracy i stanowią one bardzo dobre wprowadzenie do przedstawionych później wyników. Jednakże szkoda, że Doktorantka nie zdecydowała się na przedyskutowanie znaczenia, jakie dla fizjologicznej roli obu polimeraz mogą mieć wymieniane różnice w wierności naprawy różnych rodzajów uszkodzeń i tylko bardzo pobieżnie wspomniała o niekanonicznych funkcjach obu polimeraz.

Cel Pracy jest precyzyjnie określony. Bardzo podoba mi się umieszczenie krótkiego wprowadzenia uzasadniającego podjęcie tego typu badań w ramach projektu doktorskiego. Uważam jednak, że stwierdzenie: „nie zbadano jednak dotychczas regulacji polimeraz TLS w odpowiedzi na uszkodzenia DNA...” jest nieściśle, gdyż takie próby były wcześniej podejmowane.

Materiały i Metody używane w pracy opisane są w zwięzły i przejrzysty sposób. Schemat pokazujący różne warianty synchronizacji komórek i traktowania hodowli promieniowaniem UV lub hydroksymocznikiem ułatwia zrozumienie przebiegu tych doświadczeń. Prosiłabym o dokładniejsze wytłumaczenie, w jaki sposób obliczano relatywne poziomy mRNA dla badanych polimeraz. Nie jest to wyjaśnione w tym rozdziale, a w podpisach do rycin mówi się tylko o: „średnich wartościach RT-PCR w czasie rzeczywistym”. Ponadto chciałabym się upewnić, czy na pewno do analizy poziomu badanych polimeraz wykorzystywano po prostu osad komórek zawieszanych w buforze do nanoszenia próbek na żel?

W rozdziale **Wyniki** zebrano eksperymenty, których celem było określenie, czy indukcja uszkodzeń DNA w różnych fazach cyklu komórkowego drożdży prowadzi do zmian w poziomie mRNA i białka dla badanych polimeraz Pol eta i Rev1. Ponadto zbadano rolę, jaką w tych procesach odgrywa aktywacja punktów kontrolnych cyklu komórkowego: ścieżki odpowiedzi

na uszkodzenia DNA zależnej od Rad9 oraz ścieżki odpowiedzi na stres replikacyjny zależnej od Mrc1.

Doktorantka pokazała, że poziom mRNA dla *RAD30* nie zmienia się w cyklu komórkowym w nietraktowanych hodowlach, natomiast naświetlanie promieniowaniem UV o dawce 80 J/m² powoduje zatrzymanie komórek w fazie S i około dwukrotny przyrost ilości transkryptu. Regulacja ekspresji *REV1* wygląda nieco inaczej, gdyż poziom mRNA dla tego białka wzrasta około trzykrotnie podczas przejścia z fazy S do G2, i dynamika tego wzrostu nie ulega zmianie po naświetlaniu hodowli promieniowaniem UV. Obserwowane różnice w poziomie transkryptów dla obu genów są niewielkie, Doktorantka ostrożnie więc formułuje wnioski. Myślę jednak, że w tej sytuacji korzystne by było przeprowadzenie analizy statystycznej istotności otrzymanych wyników.

Warto podkreślić, że Doktorantka badając zmiany poziomu białka dla obu polimeraz określała poziom natywnej, nieznakowanej Pol eta, co stanowiło duże wyzwanie techniczne, ze względu na niewielką ilość tego białka w komórce. Polimeraza Rev1 była wyznakowana na C-końcu znacznikiem TEV-ProA-His₇. Co ważne, funkcjonalność fuzyjnej formy Rev1 została przez Doktorantkę dokładnie potwierdzona.

Zgodnie z wcześniej opublikowanymi danymi, Doktorantka pokazała, że w synchronicznych, nietraktowanych hodowlach dochodzi do około 2–3-krotnego zwiększenia ilości białka Pol eta i około 12-krotnego zwiększenia poziomu białka dla Rev1 podczas przejścia z fazy S do G2. Jednakże naświetlanie komórek znajdujących się na początku lub w środku fazy S promieniowaniem UV o dawce 80 J/m² znosiło tę akumulację. Był to wynik zaskakujący, gdyż dla tej dawki obserwowano zwiększenie poziomu mRNA dla obu polimeraz, więc w dalszej kolejności Doktorantka przeanalizowała wpływ mniejszych dawek promieniowania UV: 10 J/m² i 50 J/m². W tych warunkach dochodziło do akumulacji białka dla obu badanych polimeraz pod koniec wydłużonej fazy S, z tym że efekt był mocniejszy dla mniejszej dawki promieniowania. Doktorantka podkreśla odwrotnie proporcjonalną zależność pomiędzy zastosowaną dawką promieniowania a poziomem akumulacji białka dla obu polimeraz. Jest to oczywiście ciekawa obserwacja sugerująca inny sposób tolerancji uszkodzeń DNA indukowanych większymi dawkami promieniowania UV. Natomiast moim zdaniem warto by też było zwrócić uwagę na fakt, że niska dawka promieniowania wynosząca 10 J/m² powoduje zwiększenie poziomu białka dla badanych polimeraz w stosunku do warunków kontrolnych, i efekt ten jest znacznie silniejszy dla Rev1 niż Pol eta. Kiedy naświetlanie następuje w trakcie fazy S obserwuje się około 6-krotny wzrost poziomu białka dla polimerazy Pol eta, w porównaniu z około 2-krotnym wzrostem w komórkach nienaświetlanych. Natomiast dla polimerazy Rev1 wzrost poziomu białka po naświetlaniu jest aż około 80-krotny, w porównaniu z około 12-krotnym w komórkach nienaświetlanych. Świadczyć to może o nieco odmiennym sposobie regulacji i wykorzystaniu

obu polimeraz w odpowiedzi na promieniowanie UV, zwłaszcza jeśli weźmie się pod uwagę dane literaturowe o znacznie zwiększonej wrażliwości mutantu *rev1Δ* na naświetlanie promieniowaniem UV w czasie wychodzenia hodowli z fazy G1, ale nie G2, czego nie obserwuje się dla mutantu *rad30Δ*.

W podobny sposób opisuje Doktorantka wyniki eksperymentów analizujących wpływ hydroksymocznika na akumulację badanych polimeraz. Polimerazy omawiane są wspólnie i podkreśla się wzrost ich poziomu w wydłużonej fazie S. Tymczasem w hodowlach traktowanych hydroksymocznikiem widać dwukrotny spadek maksymalnego poziomu akumulacji białka dla Rev1 w porównaniu do warunków kontrolnych, podczas gdy dla Pol eta nie obserwuje się takiej różnicy.

Bardzo ciekawe jest wykazanie, że w komórkach pozbawionych Rad9 naświetlanie komórek znajdujących się w fazie S promieniowaniem UV o dawce 80 J/m² prowadzi do takiej samej akumulacji białka dla obu polimeraz jak w warunkach kontrolnych, podczas gdy w komórkach szczepu wyjściowego oraz pozbawionych Mrc1 ta akumulacja nie następuje. Mutant *rad9Δ* jest też szczególnie wrażliwy na naświetlanie promieniowaniem UV o dawce 80 J/m² w fazie S. Sugeruje to, że obserwowana dla dużych dawek promieniowania UV zmiana ścieżki tolerancji uszkodzeń może być indukowana dzięki aktywacji punktu kontrolnego cyklu komórkowego zależnego od Rad9. Niestety w pracy nie podano wrażliwości obu mutantów na dawki promieniowania 10 i 50 J/m², ani na hydroksymocznik, brak też danych dla akumulacji polimeraz w hodowlach mutantów traktowanych hydroksymocznikiem, oraz kwantyfikacji western blotów na rysunku 27. Nie można więc porównać roli Rad9 i Mrc1 w regulacji poziomu białka dla polimeraz Pol eta i Rev1, kiedy w komórkach występuje odmienny rodzaj czy mniejszy poziom uszkodzeń DNA.

W **Dyskusji** Doktorantka omawia otrzymane wyniki na tle danych literaturowych mówiących o różnicach w budowie i funkcjach Pol eta i Rev1, przedstawiając wynikającą z Jej pracy tezę o wspólnej strategii regulacji poziomu białek dla obu badanych polimeraz w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Główne elementy tej regulacji to przesunięcie akumulacji Pol eta i Rev1 z fazy G2 do wydłużonej fazy S i brak akumulacji obu białek po naświetlaniu komórek wysokimi dawkami UV. Należy podkreślić, że doktorantka konstruuje model regulacji poziomu badanych polimeraz w komórce przez dwie odmiennie ścieżki kontroli cyklu komórkowego i ilustruje go przejrzystym schematem. Jednakże skutki działania promieniowania UV i hydroksymocznika, rodzaj wywoływanych uszkodzeń, sposób aktywowania odpowiedzi komórkowej są omawiane bardzo ogólnie, bez uwzględnienia różnic wynikających z dawki czy stężenia danego czynnika. Powoduje to nieścisłości w opisie, gdy na przykład Doktorantka stwierdza, że stres replikacyjny powstały w wyniku traktowania hodowli hydroksymocznikiem aktywuje punkt kontrolny zależny od białka mediatorowego Mrc1, co prowadzi do akumulacji polimeraz Y w fazie S. Jednakże w

nietraktowanych hodowlach mutantów pozbawionego Mrc1 obie polimerazy akumulują się nawet w nieco wyższym stopniu niż w hodowlach szczepu wyjściowego, natomiast w pracy nie pokazano danych dla akumulacji polimeraz w hodowlach mutantów traktowanych hydroksymocznikiem. Moim zdaniem bardzo ciekawe i wartościowe byłoby, gdyby Doktorantka głębiej przedyskutowała pozorne sprzeczności wynikające z Jej wyników: z jednej strony akumulacja badanych polimeraz w fazie S ma się przyczyniać do zwiększenia możliwości naprawy uszkodzeń na drodze TLS, a z drugiej zmniejszenie poziomu białek tych polimeraz prowadzi do zwiększenia przeżywalności komórek w warunkach, gdy poziom uszkodzeń DNA jest wysoki. Ciekawa też jestem, jak Doktorantka interpretuje otrzymane wyniki w kontekście dwóch modeli TLS, które omawia we Wstępie.

Bibliografia jest obszerna, ale niestety spis ten został przygotowany niestarannie. Brakuje identyfikatorów doi, forma cytowań jest niejednolita, a dla niektórych pozycji brakuje nazwy czasopisma (np. pozycje 40 i 81).

Podsumowując, recenzowana praca doktorska dotyczy ciekawego zagadnienia i zawiera wyniki o dużej wartości poznawczej. Doktorantka wykazała się umiejętnościami praktycznymi pozwalającymi na uzyskanie interesujących wyników sugerujących istnienie istotnych różnic w sposobach tolerancji uszkodzeń DNA indukowanych niskimi i wysokimi dawkami promieniowania UV. Praca spełnia ustawowe wymogi stawiane pracom doktorskim i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Sobolewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

D. Dziadkowiec

dr hab. Dorota Dziadkowiec