



WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁAD GENETYKI I FIZJOLOGII KOMÓRKI
ul. Kanonia 6/8
50-328 Wrocław

tel. +48 71 375 41 26 | +48 71 375 41 28
fax +48 71 343 41 18

www.uni.wroc.pl

Wrocław, 21.12.2020 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Płonki
pt. „Agregacja białka Rbs1 i jego wpływ na kontrolę cyklu komórkowego u
drożdży *Saccharomyces cerevisiae*” wykonanej pod kierunkiem promotora prof. dr
hab. Magdaleny Boguty oraz promotora pomocniczego dr Małgorzaty Cieśli w
Zakładzie Genetyki Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w
Warszawie

Rozprawa doktorska mgr Mart Płonki dotyczy określenia jak nadprodukcja i agregacja białka Rbs1 wpływa na kontrolę cyklu komórkowego w komórkach modelowego organizmu drożdży piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae*. Biorąc pod uwagę stale rosnącą ilość doniesień o znaczeniu agregacji białek w licznych chorobach człowieka realizacja takiego tematu wpisuje się w aktualne trendy badawcze, ma znaczenie nie tylko poznawcze, ale może mieć również znaczenie medyczne, dlatego wybór celu pracy jest jak najbardziej uzasadniony.

Pierwsze wzmianki o genie *RBS1* dotyczą jego roli jako wielokopijny supresor genów *PSK1*, *PSK2* (koduują kinazy serynowo-treoninowe z domeną Pas) czy *RPC128* (koduje podjednostkę C128 polimerazy III RNA). Wiadomo, że białko Rbs1 wchodzi w interakcje z wieloma białkami np. zaangażowanymi w: transport mRNA, regulację degradacji mRNA, obróbkę tRNA, inicjację translacji, represję translacji, biogenezę rybosomów, białkami prionowymi, czy eksportyną. Do tej pory pokazano, że w warunkach fizjologicznych białko to lokalizuje się w cytoplazmie. Dotychczasowe dane sugerują także udział białka Rbs1 w oddziaływaniu z podjednostkami AC40, AC19 oraz ABC27 kompleksu Pol III RNA i jego transport do jądra komórkowego.

Wykonane przez mgr Martę Płonkę analizy bioinformatyczne pozwoliły na wykazanie homologów drożdżowego białka Rbs1 w genomach różnych eukariontów, w tym człowieka. Pokazała podobieństwo Rbs1 do białek wiążących RNA przede wszystkim w NH₂-końcu homologicznych sekwencji, wskazując tam obecność domen wiązania RNA: R3H i nieco dalej SUZ. Na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej wykazała, że białko Rbs1 jest w większości nieustrukturyzowane (wyjątek stanowi domena R3H) i poza domenami wiązania RNA, zawiera sekwencje LCR (o niskim poziomie skomplikowania) oraz potencjalną domenę prionową (pPrD). Skonstruowanie zmutowanej wersji genu *RBS1* (zamiany Arg57Ala i His61Ala) w obrębie domeny R3H umożliwiło wykazanie istotnej roli tej domeny w wiązaniu



RNA i supresji fenotypu mutantu *rpc128-1007*. Zbadała także, wykorzystując m.in. technikę cytometrii przepływową, wpływ nadekspresji Rbs1 na progresję cyklu komórkowego mutantu *rpc128-1007* wykazując, że jest to specyficzna supresja względem zamiany wysoce konserwatywnej reszty Gly1007 na resztę alaniny w Rpc128. Mutacja Gly1007Ala w Rpc128 wpływa na zaburzenie składania kompleksu lub obniżenie aktywności Pol III RNA czego konsekwencją jest obniżenie syntezy tRNA oraz objawy fenotypowe takie jak wrażliwość na niską temperaturę (fenotyp *cs*), różowe zabarwienie i zmiana morfologii (stają się większe) kolonii oraz zatrzymanie w fazie G1 cyklu komórkowego (zmniejszona ilość komórek pączkujących), jak wykazała Doktorantka powyższe cechy niwelowała nadekspresja Rbs1. Wykorzystując komórki drożdży posiadające dodatkowo mutację w genie *MAF1* (koduje negatywny regulator Pol III RNA) mgr Marta Płonka wykazała, że zatrzymanie komórek w fazie G1 cyklu komórkowego spowodowane jest przede wszystkim zaburzeniem składania kompleksu Pol III RNA w mutancie *rpc128-1007* a nie obniżeniem aktywności tego kompleksu. Potwierdziła rolę Rbs1 w sprzężeniu składania kompleksu Pol III RNA z cyklem komórkowym pokazując, że nadekspresja Rbs1 przynajmniej częściowo przyspiesza wyjście z fazy G1 cyklu komórkowego podwójnego mutantu poprzez wspomaganie składania kompleksu Pol III RNA. Doktorantka zbadała także wpływ nadekspresji dzikiej wersji białka Rbs1 oraz wersji Rbs1 ze zmutowaną domeną wiązania RNA - R3H na komórki typu dzikiego potwierdzając hipotezę, że zwiększona ilość białka Rbs1 negatywnie wpływa na wzrost, co może być skorelowane ze zdolnością wiązania RNA (tego efektu nie zaobserwowano dla zmutowanej wersji Rbs1) oraz obniża globalny poziom translacji poprzez oddziaływanie z białkami rybosomów. Autorka pokazała, że aktywna domena R3H w białku Rbs1, przy jego nadekspresji, działa negatywnie i powoduje obniżenie poziomu, ale nie stabilności białka Rbs1 stawiając hipotezę, że nadekspresja Rbs1 może mieć efekt toksyczny dla komórek z prawidłową biogenezą Pol III RNA. Istotną rolę aktywnej domeny R3H w Rbs1 wykazała też w kontekście tworzenia agregatów białka Rbs1. W szeregu doświadczeń z wykorzystaniem nadekspresji Rbs1 w wersji dzikiej i pozbawionej potencjalnej domeny prionowej (pPrD) Pani Marta Płonka pokazała, że pojedyncze, cytoplazmatyczne agregaty Rbs1: 1) nie mają formy amyloidów, ani cech typowych prionów, 2) powstają głównie w fazie stacjonarnej w zależności od warunków wzrostu komórek, 3) są strukturami dynamicznymi, ich agregacja jest odwracalna, 4) głównie lokalizują się z granulami fazy stacjonarnej, 5) domena pPrD sprzyja, lecz nie jest niezbędna do ich powstania, 6) na powstanie w mniejszym stopniu wpływa domena R3H. Doktorantka wysnuła wnioski, iż za tworzenie agregatów mogą odpowiadać oddziaływania Rbs1 zarówno z RNA jak i innymi białkami obecnymi w granulach, ale np. oddziaływanie z helikazą Upf1 hamuje agregację Rbs1. Doktorantka przeprowadziła także analizę wpływu jonów cynku na tolerancję komórek drożdży i pokazała, że delecja genu *RBS1*, a zwłaszcza nadprodukcja Rbs1 z aktywną domeną R3H, wpływają na zwiększenie tolerancji. Jony

cynku także powodują wzrost ilości agregatów Rbs1 a za ich powstanie odpowiadałaby potencjalna domena prionowa.

Rozprawa liczy 150 stron a jej układ jest typowy dla prac doktorskich, z podziałem na: zwięzłe Streszczenie w języku polskim i angielskim, Spis skrótów, Cel pracy, Wstęp teoretyczny, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusję z podsumowaniem, Wnioski oraz właściwie dobraną i cytowaną Bibliografię (320 pozycji literaturowych i 7 stron internetowych). Należy podkreślić, iż część wyników przedstawionych w recenzowanej pracy została opublikowana w 2019 roku w renomowanym czasopiśmie z listy filadelfijskiej Cell Cycle o IF₂₀₁₉ 3,699 i punktacji MNiSW – 100, w którym mgr Marta Płonka jest pierwszym autorem oraz w 2015 roku w pracy wieloautorskiej, w której mgr Marta Płonka jest kolejnym autorem, w Molecular and Cellular Biology (IF₂₀₁₅ 4,427, 35 pkt. MNiSW). Opublikowanie prac w tak dobrych czasopismach świadczy o wysokim poziomie badań prowadzonych przez Doktorantkę oraz Zespół Zakładu Genetyki Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie, który od wielu lat, z dużym sukcesem publikuje wyniki dotyczące biogenezy tRNA u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.

Rozprawę mgr Marty Płonki otwiera dość nietypowo rozdział „Cel pracy”, w którym Doktorantka sformułowała jasno i jednoznacznie 4 cele badawcze, które są zgodne z tematem rozprawy.

W drugim, obszernym (31 stron) rozdziale rozprawy „Wstępie teoretycznym”, w oparciu o najnowsze dane literaturowe, Doktorantka przedstawiła charakterystykę, rodzaj agregatów białkowych oraz ich związek ze starzeniem i chorobami neurodegeneracyjnymi człowieka. Część wprowadzenia poświęcona jest polimerazie III RNA, jej budowie, składaniu kompleksu oraz powiązaniu z cyklem komórkowym. Wstęp kończy podrozdział, w którym Autorka omówiła aktualne informacje o białku Rbs1. Rozdział ten stanowi dobre wprowadzenie do problematyki rozprawy, także ze względu na właściwie dobrane i opracowane ilustracje. Wiedza przekazana jest w konkretny, przystępny, zwięzły i klarowny sposób. Pod względem merytorycznym i językowym wprowadzenie napisane jest dobrze, pewne zastrzeżenia można mieć do sformułowań, które wymagałyby wyjaśnienia lub precyzyjnego ujęcia: podrozdział 4.6.1 „agregaty wyizolowane z mózgow starych myszy”, podrozdział 4.7.2 „W tym momencie cyklu komórkowego tDNA znajduje się w pobliżu kompleksu porów jądrowych, gdzie jest zakotwiczone za pomocą nukleoporyn Nup60 i Nup2 oraz kohezyny” (sugerując, że chodzi o 1 kohezynę, podczas gdy jest to nie 1 kompleks białek kohezynowych).

Kolejne dwa rozdziały zatytułowane „Materiały”, „Metody” (18 stron) zawierają informacje odnośnie wykorzystanych materiałów oraz stosowanych metod eksperymentalnych. W swoich badaniach Doktorantka wykorzystwała szereg metod biologii molekularnej i komórkowej drożdży, właściwych do rozwiązania problemów będących przedmiotem rozprawy doktorskiej. Rozdział ten jednak budzi najwięcej zastrzeżeń. Opis stosowanych metod nie zawsze jest na tyle precyzyjny, by istniała możliwość powtórzenia

opisywanych doświadczeń, np. warunki wytrząsania z kulkami, warunki sonikacji (6.24, czy próbki pomiędzy cyklami były w lodzie?), warunki ligacji (6.8, 6,19), warunki wirowania (brak temp. w 6.2, 6.20, 6.26), warunki transferu białek (6.12, 6.13). Znalazły się też sformułowania o charakterze żargonowym: „fazę wodną z plazmidem” (6.1), „DNA plazmidowe, które transformowano do bakterii, gdzie zostało namnożone” (6.18), „bufor do próbek” (6.13), „oddawano do sekwencjonowania” oraz takie wymagające wyjaśnienia np. „Namnożone fragmenty DNA oraz fragmenty (jakie?) plazmidów sekwencjonowano” (6.7). Właściwsze byłoby podanie stężenia stosowanych enzymów niż ilości (6.4). Czy w rozdziale 6.8 Doktorantce chodziło o mutagenezę ukierunkowaną (błąd edytorski – mutageneza kierowana?)?. Prosiłabym o wyjaśnienie czy w rozdziale 6.9 Autorce chodziło o izolację całkowitego DNA z komórek drożdży (w rozdziale Wyniki str. 79 takie określenie się znajduje)? W tej części brakuje mi także informacji np. ile razy powtarzano analizy Western blot.

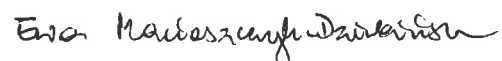
W rozdziale „Wyniki”, składającym się z 4 podrozdziałów (48 stron), Doktorantka przedstawiła główne osiągnięcia realizowanych badań, które odpowiadają założeniom zawartym w celu pracy. Opisane są jasno i precyzyjnie, poprzedzone krótkim wprowadzeniem teoretycznym, każdy etap badań jest szczegółowo uzasadniony, zarówno w zakresie strategii badawczej, wyboru kontroli czy techniki badawczej a wyciągane wnioski są poprawne. Wyniki zostały zaprezentowane w formie graficznej w postaci 25 bardzo starannie przygotowanych, w większości wieloelementowych, rysunków i 3 tabel, których jakość nie budzi zastrzeżeń. Na podkreślenie zasługują: warsztat metodyczny, duża ilość wykonanych badań i zebranych danych. Lektura tej części pracy była bardzo interesująca. Do tej części pracy mam 1 uwagę dotyczącą Rys. 26C czy w panelu „nałożone” dla próby z Rbs1R3H-mCh jest prawidłowa fotografia, bo nie widać tam kolokalizacji z Pab1-GFP a zdjęcie wydaje się być identyczne jak w panelu „Pab1-GFP”? Mam także pytania do Autorki pracy i proszę o komentarz: Jakie były przesłanki za wyborem genu *CLN1* jako genu referencyjnego w reakcji qPCR (Rys. 16C), czy była wykonana analiza z innym genem referencyjnym? Jak można zinterpretować wyniki zebrane w tabeli Rys. 16D (chodzi o różnice między np. [RBS1] a [RBS1-Myc])? W jakiej fazie wzrostu znajdowały się komórki drożdży w doświadczeniu opisanym jako Rys. 23? Czy było wykonane doświadczenie z innymi jonami (niż cynku), w celu zbadania ich wpływu na tworzenie agregatów Rbs1?

W 11 stronicowej „Dyskusji”, podzielonej na 6 części, autorka dobrze opisała i ostrożnie, ale też krytycznie przedyskutowała własne wyniki z danymi literaturowymi. Podjęła próby wytłumaczenia wątpliwych wyników. Dyskusję kończy krótkie „Podsumowanie” i „Wnioski”, w których doktorantka w zwięzły sposób dokonała syntezy przeprowadzonych badań, a następnie w postaci 7 punktów zebrała najważniejsze osiągnięcia i konkluzje. Ciekawa dyskusja pobudziła do zadania pytań, w związku z tym chciałabym prosić o odniesienie się mgr Marty Płonki, podczas obrony, do następujących zagadnień: czy Doktorantka mogłaby zaproponować jakie dodatkowe eksperymenty można

byłoby wykonać, aby sprawdzić jak struktura Rbs1 wpływa na tworzone przez to białko agregaty oraz jako podsumowanie uzyskanych wyników zasugerować schemat obrazujący funkcje Rbs1 w komórce drożdży *S. cerevisiae*? Ponieważ opisane w pracy badania były przeprowadzone w warunkach nadekspresji, proszę o odpowiedź na pytanie: czy i kiedy w naturalnych warunkach nadekspresja Rbs1 w komórkach drożdży mogłaby odgrywać fizjologiczne znaczenie?

Praca od strony edytorskiej przygotowana jest starannie. Drobne błędy interpunkcyjne, edytorskie, stylistyczne we wszystkich częściach pracy, skróty myślowe (nieliczne, np. aminokwas, zamiast reszta aminokwasowa; N koniec białka, zamiast aminowy koniec białka), (w „Bibliografii” w 31, 72, 100, 167 pozycjach błędy w tytule, niekompletne dane w pozycjach 127, 178) uchybienia, które z obowiązków recenzenta muszę wymieniwać, nie mają one jednak wpływu na wartość naukową recenzowanej rozprawy doktorskiej.

Podsumowując, cykl doświadczeń wykonanych w ramach pracy doktorskiej przez Panią mgr Martę Płonkę stanowi solidną, dobrze przemyślaną, poprawnie wykonaną i opisaną pracę naukową, którą oceniam bardzo wysoko. Doktorantka zrealizowała założenia i cel pracy, a uzyskane oryginalne wyniki opublikowała. Uważam, że recenzowana praca doktorska odpowiada wszystkim ustawowym wymogom stawianym rozprawom doktorskim określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Na tej podstawie składam wniosek do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o dopuszczenie mgr Marty Płonki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Ewa Maciaszczyk-Dziubińska, prof. UW

