

Dr hab. Wojciech Pokrzywa

Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, Warszawa

## Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Płonki

### *„Agregacja białka Rbs1 i jego wpływ na kontrolę cyklu komórkowego u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*”*

#### 1. Ocena merytoryczna

##### a) trafność podjętej problematyki badawczej i jej oryginalność

W komórkach, rozdział faz białek jest ściśle regulowany, aby utrzymać metastabilny stan kondensatów molekularnych i uniknąć ich dalszej agregacji w warunkach stresu proteotoksycznego. Prowadzi to do stworzenia nieobłonionych struktur, stanowiących podstawę wielu rodzajów tzw. granul. Do ich powstania przyczyniają się oddziaływania białko-białko i białko-RNA.

Temat podjęty przez Autorkę dotyczy drożdżowego białka Rbs1- jego struktury i pełnionej funkcji, szczególnie w odniesieniu do Polimerazy III RNA oraz jego właściwości priono-podobnych.

Temat podjęty przez Autorkę jest istotny i aktualny. Po pierwsze dotyczy badań molekularnego mechanizmu wspomaganego formowania Pol III przez Rbs1. Po drugie jest związany ze zdolnością Rbs1 do tworzenia agregatów wewnątrzkomórkowych, a proces regulacji rozdziału faz białek w warunkach normalnych i stresowych jest nadal słabo poznany.

##### b) uzyskane rezultaty i ich znaczenie dla nauki

Uzyskane wyniki wykazały, iż Rbs1 wiąże się z kompleksem Polimerazy III, bierze udział w jego składaniu i może ułatwiać jego translokację do jądra. Również, dzięki wnikliwej analizie bioinformatycznej Autorka wyszukała pokrewieństwo białka Rbs1 do rodziny białek zawierających domeny R3H i powiązanych z ludzkim białkiem ARPP21. W dalszych badaniach udało jej się pokazać znaczący wpływ tej domeny na m.in. supresję fenotypu mutantu *rpc 128-10007*, charakteryzującego się zaburzonym składaniem kompleksu Polimerazy III, a tym samym translacji, oraz zdolności do tworzenia agregatów przez białko Rbs1 w warunkach jego nadekspresji. Co więcej, praca zawiera charakterystykę powstających agregatów, dostarcza informacji na temat ich nieamyloidowego charakteru i sugeruje ich rolę w fizjologii komórki drożdży. Wyniki dysertacji zostały wykorzystane w artykułach opublikowanych w *Cell Cycle* oraz *Molecular and Cellular Biology* o współczynniku oddziaływania odpowiednio IF = 3.3 i 3.7. Artykuły wchodzące w skład rozprawy to prace wysokiej jakości. Dobrze i klarownie napisane, zawierające wnikliwe analizy. Ryciny są estetyczne i przejrzyste.

Sukces publikacyjny wskazuje na jakość prezentowanych danych, a podczas procesu publikacji zostały one już pozytywnie zweryfikowane przez specjalistów.

### **c) poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna**

Oceniana rozprawa doktorska została napisana po polsku. Mimo, iż Doktorantka nie ustrzegła się błędów stylistycznych i interpunkcyjnych, rozprawa napisana jest klarownie oraz poprawnie pod względem formalno-językowym. Natomiast przekład na angielski Streszczenia mógłby być staranniejszy i bardziej zgodny z polską wersją językową.

## **2. Ocena metodologiczna**

### **a) dobór literatury i umiejętność jej wykorzystania**

Autorka dobrała odpowiednią literaturę, cytując adekwatne prace oraz wyciągając właściwe wnioski. W kilku miejscach można było zdecydować na aktualniejsze opracowania i wykorzystać je w we wstępie i dyskusji.

### **b) poprawność formułowania problemów badawczych**

Wartość merytoryczna rozprawy nie budzi zastrzeżeń. Głównym celem badań prowadzonych było dogłębniejsze scharakteryzowanie funkcji białka Rbs1 i w toku badań udało się naświetlić zarówno pozytywne, jak i negatywne aspekty jego zwiększonej produkcji w komórkach drożdży. Doktorantka zainicjowała swoją pracą ciekawy problem badawczy dotyczący agregacji białka Rbs1. Ponadto, logicznie sformułowała powiązane hipotezy badawcze i z powodzeniem je udowodniła. Praca opiera się na przemyślanym i dobrze zaplanowanym i wykonanym cyklu doświadczeń. Jednocześnie wyniki uzyskane przez Autorkę stanowią istotny wkład do wiedzy na temat mechanizmów potencjalnych zaburzeń transkrypcyjnych związanych z tendencją do agregacji czynników odpowiedzialnych za funkcjonalność polimeraz.

### **c) trafność doboru metod i narzędzi badawczych**

Doktorantka wykorzystwała szereg metod badawczych. W ich zakres wchodziły metody biologii komórki, biologii molekularnej i analizy bioinformatyczne. Wydaje się, że Autorka rozważnie dobrała narzędzia badawcze.

### **d) prawidłowość struktury pracy**

Przedstawiona do oceny rozprawa przedstawiona została na 151 stronach, podzielona na części, obejmujące: streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, materiały i metody zastosowane w pracy, wyniki oraz dyskusję. Praca ma zatem prawidłowy układ i struktury podziału treści.

Dyskusyjny jest tytuł, sugerujący związek między agregacją Rbs1 oraz wpływem tego procesu na cykl komórkowy, czego ta praca bezpośrednio nie dotyczy. Wstęp jest długi i zaczyna się od opisu procesu agregacji w komórkach. Imponująca jest ilość przekazywanej informacji, ale zastanawiam się nad ich właściwą selekcją i odpowiednim ustawieniem w kolejności ważności. Wydaje mi się, że najistotniejsza część, to ta, dotycząca samego białka Rbs1, a zajęła niewielką, ostatnią część wstępu. Natomiast agregacja stanowi ważny, ale ostatni rozdział w części eksperymentalnej i podobnie tak bym go

umieścić we wstępie. Również wybór informacji do wstępu, szczególnie do części o agregacji mógłby być bardziej selektywny, a informacje uporządkowane. Brakuje tabel podsumowujących rodzaje agregatów/granul, ich charakterystykę, molekularne podstawy itp. W części eksperymentalnej zawarte hipotezy są dobrze uzasadnione, a wnioski wyciągnięte z obserwacji prawidłowe. Czyta się tę część swobodnie. Eksperymenty zostały przeprowadzone z dbałością o kontrole, ale brakuje dokładniejszych analiz statystycznych eksperymentów.

Dyskusja jest odpowiednio zwięzła, aczkolwiek szczegółowa i poszerzona o dodatkowe informacje z najnowszych wyników z Pracowni. Podobało mi się wiele fragmentów na temat zaobserwowanych fenotypów i funkcji białka Rbs1 w procesie składania Pol III RNA oraz mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za agregację Rbs1 i jego właściwości prionowych. Jednak w podsumowaniu trudno było mi się rozeznąć, co jest hipotezą, a co zostało zweryfikowane eksperymentalnie.

Ogólnie, praca mogłaby być staranniejsza, gdyż zawiera wiele błędów językowych. Dodatkowo, brakuje na jednej z figur histogramu cyklu komórkowego jednego z mutantów. Występują też nieścisłości, np.: w opisie metody były 3h, a w części eksperymentalnej 2h, na wykresie było 20%, a w tekście 2%. To są może drobiazgi, ale świadczą o niestaranności w przygotowaniu tej rozprawy.

### 3. Uwagi

Brakuje odniesień do nazw i skrótów angielskich pojęć.

Na stronie 52, punkt 6.15 zastosowana metoda nie jest opisem profilowania rybosomów.

W punkcie 6.17: „Ustalanie globalnego poziomu translacji” moje pytanie dotyczy wykonania procedury. Czy zgodnie z protokołem komórki hodowane były w pożywce pozbawionej metioniny? Brakuje tej informacji.

7.2.1, duży fragment tego podrozdziału nie dotyczy badania fenotypu mutantu; skłaniałabym się do wydzielenia kolejnego podrozdziału: analiza modelu struktury Pol III RNA

Punkt 7.2.2, strona 71. Na zdjęciach przedstawiających morfologię komórek w kontraście fazowym trudno odczytać skalę, również brakuje opisu zastosowania kontrastu fazowego w metodach. Czy była również rozważana opcja zbadania kontrolnie morfologii i proliferacji komórek mutantu *rpc128-1007* nadekspresjonującego Rbs1 ze zmutowaną domeną R3H?

W podrozdziale 7.2.3 wyniki skupiły się bardziej na pokazaniu, że obniżona transkrypcja tRNA nie jest przyczyną opóźnionego wyjścia z fazy G1 cyklu komórkowego i tego powinien dotyczyć tytuł.

Punkt 7.3.1, strona 79. Tytuł podrozdziału mógłby być bardziej precyzyjny, tak jak sformułowano go w spisie treści: Domena R3H negatywnie wpływa na stabilność plazmidu lub ekspresję Rbs1

Rys. 13., poziom prekursorowego tRNA jest wyższy w podwójnym mutancie niż w *rpc128-1007*, ale jeśli się weźmie pod uwagę wszystkie prekursory tRNA, szczególnie t(L), to nadal to różni się od szczepu dzikiego; pytanie, czy to nie mogłoby mieć wpływu na postęp cyklu komórkowego w podwójnym mutancie?

Rys. 14, brakuje histogramu *rpc128-1007*

Rys. 17., ma jakiej podstawie przyjęto istotność statystyczną  $p < 0.1$ ?

Rys. 21, panel B, brakuje transformantów zawierające plazmid kontrolny z mCherry.

Rys. 25., brakuje analizy mutantów Rbs1.

Rys. 26, proszę o wyjaśnienie przyjętej strategii liczenia procentu kolokalizacji agregatów Rbs1-mCh z określonymi granulami, ze względu na to, że suma kolokalizacji z poszczególnymi markerami znacznie przekracza 100%.

#### 4. Pytania

1. W jaki sposób agregaty Rbs1 mogłyby się przyczyniać do zwiększonej oporności komórek drożdży na jony cynku?
2. Jak nadekspresja Rbs1 wpływa na aktywność polimerazy III w szczepie WT?
3. Dlaczego nadprodukcja białka Rbs1 ze zmienioną domeną R3H nie powoduje obniżenia poziomu translacji? Czy może to być związane z niemożnością zmutowanego białka do wiązania sekwencji regulatorowych 3'UTR?
4. Rys. 30, jaki jest związek między niezdolnością do tworzenia agregatów przez Rbs1 a słabszym wzrostem hodowli w czasie stresu?
4. Czy białko Cdc48 reguluje granulację Rbs1?

#### 5. Ocena

Moja ocena rozprawy doktorskiej mgr Marty Płonki zatytułowanej: „*Agregacja białka Rbs1 i jego wpływ na kontrolę cyklu komórkowego u drożdży *Saccharomyces cerevisiae**” jest pozytywna. Badania naukowe stanowiące podstawę tej pracy doktorskiej są na właściwym poziomie technicznym i merytorycznym. Uważam, że rozprawa spełnia warunki określone ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Wnoszę o dopuszczenie mgr Martę Płonkę do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

