



Wrocław, 09.05.2016

Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Karola Kramarza
pt. „Rola ortologów Rad5 w naprawie DNA u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i
***Schizosaccharomyces pombe*”**

Materiał genetyczny każdej żywej komórki jest narażony na działanie egzo- i endogennych czynników uszkadzających DNA, co może prowadzić do powstawania licznych mutacji często letalnych dla komórki. Efektem działania niektórych czynników jest stres replikacyjny, w wyniku którego dochodzi do zatrzymania widełek replikacyjnych lub nawet do ich rozpadu, czego skutkiem mogą być dwuniciowe złamania DNA i powstawanie mutacji. Aby temu zapobiec organizmy wykształciły szereg mechanizmów umożliwiających naprawę uszkodzonego DNA. Celem recenzowanego doktoratu było poznanie roli ortologów Rad5 w naprawie DNA związanej ze stresem replikacyjnym. Praca jest kontynuacją długoletnich badań zespołu prof. dr hab. Roberta Wysockiego nad molekularnymi podstawami komórkowej odpowiedzi na stres. Badania prowadzone były na dwóch modelowych gatunkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*. Należy podkreślić wagę podjętej przez Doktoranta tematyki badań nie tylko ze względu na ubiegłoroczną nagrodę Nobla w dziedzinie chemii, ale również dlatego, że upośledzona odpowiedź na stres replikacyjny jest przyczyną wielu poważnych chorób u ludzi. Tak więc poznanie mechanizmów molekularnych naprawy DNA związanej ze stresem replikacyjnym może w przyszłości pomóc w diagnostyce i leczeniu wielu groźnych chorób, których przyczyną jest upośledzona odpowiedź na stres replikacyjny.

Wyniki doktoratu Pana Karola Kramarza zostały opublikowane w dwóch artykułach w bardzo dobrych czasopismach: *Nucleic Acids Research* (jako drugi autor) oraz w *DNA Repair* (jako pierwszy autor). Ponadto Doktorant jest pierwszym autorem manuskryptu „Uls1 participates in the regulation of DNA damage tolerance pathway choice”, który jest obecnie w recenzji. Opublikowana część wyników ich interpretacja oraz dyskusja zostały już ocenione przez recenzentów.

Oceniana praca ma typowy układ przyjęty dla rozpraw doktorskich (Wstęp, Cel...). Moim zdaniem, biorąc pod uwagę, że część wyników została już opublikowana, a pozostała część

zawarta jest w manuskrypcie wystarczyłoby połączyć te prace razem wraz z wprowadzeniem i syntetyczną dyskusją podsumowującą uzyskane w trzech pracach wyniki.

We **Wstępie** Doktorant przedstawił najważniejsze informacje niezbędne do zrozumienia dalszych rozdziałów rozprawy doktorskiej. Rozdział ten czyta się dobrze, a czytelne ryciny ułatwiają zrozumienie często złożonych mechanizmów takich jak ścieżki naprawy dwuniciowych złamań DNA zależne od homologicznej rekombinacji czy też postreplikacyjnej naprawy DNA. W rozdziale tym czasami brakowało mi odniesień do innych niż drożdże organizmów.

Cel pracy został jasno i precyzyjnie sformułowany.

W rozdziale **Materiały i Metody** obszernie przedstawiono stosowane techniki doświadczalne. Na szczególną uwagę zasługuje duża liczba skonstruowanych szczepów (prawie 50 szczepów!). Wydaje mi się, że składy pożywek powinny być podane osobno. Technika „Southern blot” obejmuje elektroforezę, przeniesienie DNA na membranę i hybrydyzację. Natomiast według Doktoranta technika ta jest tylko metodą hybrydyzacji. Nie wiem dlaczego opisano analizę *Western blotting* osobno dla każdego analizowanego białka, przez co powstało pięć podobnych do siebie opisów (zwłaszcza na ich początku). Ponadto, moje zastrzeżenia budzi „analiza western blot poziomu fosforylacji kinazy efektorowej”, w której *de facto* oznacza się poziom kinazy (stosując przeciwciała anty-Rad53), a nie poziom jej ufosforylowania. W rozdziale tym Doktorant nie uniknął typowych błędów, przykładowo przy podawaniu prędkości wirowania w obrotach/min. powinien być podany typ rotora.

W rozdziale **Wyniki** na szczególną uwagę zasługują tytuły podrozdziałów, które formułowane są w postaci czytelnych wniosków. Wyniki napisane są poprawnym językiem i do tej części mam niewiele zastrzeżeń. Część rycin przedstawionych w rozprawie doktorskiej pochodzi z publikacji Doktoranta i pod tymi rycinami powinna być umieszczona informacja o pochodzeniu danej ryciny. Pokazując zdjęcia mikroskopowe mutantów podwójnych i potrójnych (ryc. 4.1) dla porównania należałoby pokazać zdjęcia szczepu WT i mutantów pojedynczych. Przy analizie mikroskopowej mutantów należy podawać liczbę analizowanych komórek. Czy stosując analizę *Western blotting* oraz przeciwciała skierowane przeciwko Rad5 (ryc. 4.1A) można stwierdzić, że kinaza ta jest hiperfosforylowana? W ilu miejscach kinaza Rad5 jest fosforylowana?

Dyskusja jest obszerna (14 stron) i wybiega poza obszar dyskusji zawartej w opublikowanych artykułach. Na podkreślenie zasługuje przedstawienie modelu działania białka Uls1 w odpowiedzi komórek na stres replikacyjny, w którym Doktorant pokazał, że białko Uls1 uczestniczy w regulacji poziomu sumoilowanej formy helikazy Srs2 oraz promowaniu interakcji tej helikazy z jądrowym antygenem komórek proliferujących. Ciekawą częścią Dyskusji jest porównanie funkcji ortologów Rad5.

Na zakończenie chciałabym podzielić się kilkoma uwagami/pytaniem i prosić Doktoranta o ustosunkowanie się do nich.

1. Jakimi innymi metodami można udowodnić, że kinaza Rad53 jest hiperfosforylowana?
2. Doktorant często porównuje różne białka (np. helikazy) pro- i eukariotyczne na przykładzie bakterii i drożdży. Czy wiadomo coś na temat analogicznych białek u archeonów?
3. Proszę syntetycznie omówić zalety i wady stosowania *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe* jako modelowych organizmów eukariotycznych.
4. Czy badania podjęte w doktoracie oraz ich ewentualna kontynuacja mogą przyczynić się w przyszłości do lepszego zrozumienia chorób związanych z nieprawidłową odpowiedzią na stres replikacyjny?
5. Proszę syntetycznie (np. w formie graficznej, *graphical abstract*) przedstawić najważniejsze 1-2 wnioski z przeprowadzonych badań.

Drobne uwagi:

1. Na zdjęciach mikroskopowych komórek powinna podana być skala.
2. Na zdjęciach żeli PFGE powinny być opisane wielkości fragmentów, a przy analizie *Western blotting* masy cząsteczkowe analizowanych białek oraz markery mas cząsteczkowych.
3. Ryc. 4.9 zawiera nieco mylący podpis „Po zakończeniu elektroforezy DNA transferowano na membranę nylonową i poddawano hybrydyzacji z sondą dla rDNA, a następnie wykonano *Southern blot*”
4. Błędy stylistyczne: „ciężkocząsteczkowe, podążające aparaty transkrypcyjne, pellet, DNA transferowano”.

Powyższe uwagi nie mają dużego wpływu na pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej. Na uwagę zasługuje fakt, że znaczna część wyników Doktoranta przedstawiona w rozprawie została opublikowana w bardzo dobrych czasopismach.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Karola Kramarza do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na ogrom pracy włożonej w doktorat oraz fakt, że wyniki są już częściowo opublikowane wnoszę o wyróżnienie recenzowanej rozprawy.



Prof. dr hab. Jolanta Zakrzewska-Czerwińska