



Warszawa, 15.02.2022

dr hab. Adrianna Skoneczna, prof. instytutu
Pracownia Mechanizmów Stabilności Genetycznej
Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN

**Ocena pracy doktorskiej pani mgr Róży Szatkowskiej pt.
“The effects of RNA polymerase III activity on carbon metabolism in the
Saccharomyces cerevisiae model organism”**

Oceniana praca doktorska została wykonana na wydziale Chemii Politechniki Warszawskiej pod kierunkiem pani dr hab. Małgorzaty Adamczyk. Autorką pracy jest pani mgr Róża Szatkowska, która studiowała na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie, gdzie wykonała również swoją pracę magisterską. Wydział Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie nadał jej tytuł magistra Biotechnologii o specjalności Biotechnologia Molekularna 25.06.2014 r. Studia doktoranckie mgr Róża Szatkowska rozpoczęła w grudniu 2014 r na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej.

W pracy podjęto próbę wykazania związków między metabolizmem komórkowym a poziomem ekspresji genów kodujących tRNA. Do badania tych zależności wybrano komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, jako organizm dobrze scharakteryzowany, dla którego wypracowano wiele dogodnych technik laboratoryjnych umożliwiających szczegółową analizę biochemiczną, genetyczną i fenotypową. Co więcej, dla tego organizmu, używanego często jako model komórki eukariotycznej, istnieją również obszerne bazy danych i szereg narzędzi informatycznych umożliwiających prowadzenie analiz bioinformatycznych, w tym możliwość analizy danych proteomicznych czy badania ścieżek metabolicznych, wraz z antycypacją wpływu jaki będą miały zmiany poziomu czy aktywności enzymów biorących udział w danych szlakach na ich efektywność. Do przeprowadzenia badań wybrano szczepy drożdżowe scharakteryzowane uprzednio w literaturze jako szczepy o zmienionej ekspresji genów kodujących tRNA i wykazujące związki tej ekspresji z metabolizmem węgla. Wiadomo, że ekspresja genów tRNA regulowana jest zależnie od źródła węgla dostępnego komórkom; w obecności glukozy tRNA jest intensywnie transkrybowane, podczas gdy w obecności glicerolu transkrypcja tych genów zamiera. Odpowiedzialne za ten efekt jest białko Maf1, negatywny regulator polimerazy RNA III, którego lokalizacja komórkowa zmienia się wraz z wyczerpaniem się fermentowalnego źródła węgla z cytoplazmatycznej na jądrową, co owocuje wyciszeniem ekspresji genów tRNA. W pracy wykorzystano fakt, że w szczepie *maf1Δ* ekspresja genów tRNA jest stale wysoka, natomiast w szczepie *rpc128-1007*, w którym podstawienie aminokwasowe Gly1007Ala obecne w jednej z podjednostek polimerazy RNA III (Ret1, inaczej

Rpc128 lub Pds2) skutkuje obniżoną ekspresją genów tRNA bez względu na dostępne źródło węgla. Wyniki zaprezentowane w ocenianej pracy pokazują jak wiele można się dowiedzieć o regulacji procesów metabolicznych umiejętnie stosując dostępne technologie, wykorzystując do tego dwa szczepy o przeciwstawnych fenotypach i szczep kontrolny.

Rozprawa ma postać monografii o długości 267 stron, napisanej w języku angielskim, opatrzonej streszczeniem w języku polskim. Praca ma układ typowy dla prac eksperymentalnych, z podziałem na rozdziały. Składają się na nią: wstęp (25 stron), opisu celu pracy, materiałów i metod (46 stron), oraz wyników (73 strony), dyskusji (35 stron), podsumowania oraz bibliografii (509 pozycji). W pracy umieszczono ponadto spis tabel, rycin i skrótów użytych w tekście, oraz załącznik zawierający dodatkowe tabele i ryciny.

Wstęp jest napisany przejrzysto, przedstawia informacje konieczne do świadomego śledzenia dalszej części rozprawy doktorskiej. Opisano w nim zależności pomiędzy polimerazą RNA III a jej regulatorem Maf1, regulację lokalizacji komórkowej i aktywności Maf1 na drodze fosforylacji/defosforylacji w kontekście warunków wzrostu, z naciskiem na dostępne źródła węgla, oraz wprowadzających/zdejmujących reszty fosforanowe enzymów, jak również sprawności ścieżek sygnałowych. Opisane zostały poznane dotychczas fenotypy szczepów *maf1Δ* i *rpc128-1007*. Przedstawione zostały także ścieżki regulacyjne nadzorujące odpowiedź komórek na różnego rodzaju stresy, w tym głodzenie glukozowe, oraz ich wzajemne relacje. W końcu, omówione zostały mechanizmy pobierania glukozy i alternatywnych źródeł węgla.

Celem pracy było przeprowadzenie analizy porównawczej szlaków metabolicznych, głównie metabolizmu węgla, szczepów *maf1Δ* i *rpc128-1007*, charakteryzujących się zmienioną (odpowiednio, nadmierną lub stłumioną) ekspresją genów tRNA.

Materiały i Metody użyte w toku doświadczeń zostały opisane wyczerpująco. Zwraca uwagę duża różnorodność zastosowanych w pracy metod. Poczynając od klasycznych technik genetycznych i biologii molekularnej, których zastosowanie umożliwiło m.in. przygotowanie koniecznych do prowadzenia badań szczepów (43 z spośród 83 skonstruowała Doktorantka), poprzez liczne testy biochemiczne i biofizyczne, obejmujące również analizę proteomu, metody bioinformatyczne, aż po techniki mikroskopowe.

W tym rozdziale szczególnie często pojawia się problem, który jest obecny także w pozostałych częściach rozprawy, mianowicie ignorowanie zasad zapisu nazw genów, mutacji, czy fuzji genowych przyjętych dla organizmu *Saccharomyces cerevisiae*. Tabela 1, zawierająca genotypy użytych w trakcie realizacji badań szczepów drożdżowych jest pełna tego rodzaju błędów. Co więcej, brak konsekwencji w stosowaniu nawet „autorskich” wersji zapisu; zdarza się, że Doktorantka stosuje różne warianty zapisu tej samej mutacji nawet na jednej stronie czy w obrębie jednej ryciny (np. Fig.18, *hxx2Δ* vs *hxx2-Δ* i *hxx1Δ* vs *hxx1-Δ*). W związku z tym proszę o przedstawienie zasad zapisu nazw białek, genów, mutacji i fuzji genowych ustalonych dla drożdży *S. cerevisiae*.

W sekcji 3.2.4 Doktorantka pisze o „homologous recombination of yeast cells”. Coś takiego nie istnieje. Rekombinacja homologiczna to proces dotyczący DNA a nie komórek. W tym samym akapicie mowa o „medium lacking selective nutrient”, chodzi raczej o „medium lacking nutrient used for selection”. Takich niefortunnych sformułowań jest zresztą w tekście rozprawy więcej.

W sekcji 3.2.27 dotyczącej przygotowywania prób wyznakowanych ^{13}C do celów analizy NMR przedstawiony jest inny schemat hodowania szczepu *rpc128-1007* niż szczepów *maf1Δ* i kontroli. Rozumiem chęć uniknięcia selekcji rewertantów w czasie hodowli szczepu *rpc128-1007* w obecności glukozy, niemniej stosowanie różnych źródeł węgla podczas hodowli porównywanych szczepów do celów znakowania może mieć wpływ na wydajność znakowania i na ostateczne wyniki. Czy nie lepiej rozważyć hodowlę szczepów na podłożu z glicerolem i śladową ilością glukozy?

Rozdział Wyniki jest bardzo obszerny ze względu na dużą liczbę wyników zawartych w 46 figurach. Przejście przez tę olbrzymią liczbę danych ułatwia sposób ich przedstawienia. Większość podrozdziałów sekcji Wyniki rozpoczyna racjonalne uzasadnienia podjęcia danych badań a kończy krótką konkluzją pozwalającą na przejście do następnych etapów pracy. Percepcję ułatwiają klarowne, dobrze przygotowane schematy. Należy też docenić staranność i estetykę licznych wykresów zamieszczonych w rozprawie. Szkoda, że na niektórych z nich zabrakło informacji o istotności statystycznej otrzymanych wyników (np. Fig. 9, 10, 24, 39). Niektóre z podpisów rysunków nie są precyzyjne. Przykładem może być tu podpis Fig. 10, w którym mowa o „Mig1, Rtg1 and Tup1 cellular concentration”, gdy tymczasem analizowane są poziomy tych białek, a nie ich stężenia. Nota bene, na żadnym z obrazów przedstawiających wynik hybrydyzacji typu western nie zaznaczono lokalizacji poszczególnych prążków wzorca mas, co uniemożliwia określenie masy wykrywanych w doświadczeniu białek. Brak kontroli negatywnych uniemożliwia z kolei weryfikację specyficzności otrzymanych sygnałów.

Podpis Fig. 12 informuje: „Mth1 protein has increased stability in the yeast strain with lowered RNAP III activity”, gdy tymczasem ponownie analizowano poziom białka, a nie jego stabilność. Ponieważ określenia „stability” oraz „concentration”, używane zamiast „level” w kontekście porównywania poziomów białek, pojawiają się nie tylko w podpisach rysunków, ale również w tekście rozprawy, a nawet w tytule podrozdziału (np. 4.1.4), zachodzi obawa, że Doktorantka nie uświadamia sobie różnicy ich znaczeń. Stąd moje pytania:

Jak można by było określić stężenie białka w komórce?

Jakimi metodami można określić stabilność białka?

Chciałabym się również dowiedzieć dlaczego w eksperymencie analizującym poziom białka Mth1, którego wyniki przedstawiono na Fig. 12, zastosowano technikę immunoprecypitacji, podczas gdy w innych przypadkach, np. podczas analizy poziomu białek Mig1, Rtg1 i Tup1 (Fig.10) jej nie stosowano, tylko badano poziom białek w ekstraktach komórkowych?

Do normalizacji sygnałów analizowanych białek Doktorantka stosuje Vma2. Proszę wyjaśnić skąd się biorą duże różnice intensywności sygnałów Vma2 uzyskanych w

różnych doświadczeniach dla próbek przygotowanych z komórek szczepów niosących te same mutacje (*maf1Δ* i *rpc128-1007*), różniących się wyłącznie obecnością metek (zwykle HA) przyłączonych do różnych białek (Fig. 12, 34, 42, 43, 48)? Zakładam, że gdyby Doktorantka zauważyła wpływ dodania takiej metki do określonego białka na jego funkcje biologiczne, nie stosowałaby takiego sposobu detekcji.

Czy zdaniem Doktorantki, poziomy analizowanych białek, normalizowane do kontroli dającej zróżnicowane sygnały w kolejnych doświadczeniach, są wiarygodne?

Fig. 34 przedstawia m.in. kwantyfikację wyników analizy poziomu Gcn4. Moim zdaniem kwantyfikacja ta nie przystaje do obrazu przedstawionego blotu. Przeprowadzona przeze mnie analiza densytometryczna załączonego blotu potwierdza moje wątpliwości. Albo wybrano do przedstawienia w rozprawie odległy od pozostałych powtórzeń biologicznych wynik, albo należy przeprowadzić kwantyfikację ponownie. Z analizy przedstawionego blotu wynika, że poziomy Gcn4 w analizowanych trzech szczepach są podobne, tylko w warunkach hodowli na glukozie ich poziomy są trochę wyższe niż w warunkach hodowli na glicerolu. Przypominam, że uzyskany wynik jest podstawą późniejszych analiz i wniosków.

Skoro już mowa o wynikach eksperymentów, które mogą być źródłem pochopnych wniosków, to chciałabym zwrócić uwagę na sposób przeprowadzenia prostego eksperymentu porównującego tempo wzrostu analizowanych szczepów. Wśród badaczy rozpowszechniony jest błędny zwyczaj wyznaczania krzywych wzrostu względem OD₆₀₀. Tymczasem, wzrost OD₆₀₀ nie zawsze koreluje z tempem podziałów komórek. Jest wypadkową tempa ich podziałów, oraz ich cech morfologicznych, takich jak wielkość, przezierność, grubość ściany. Co więcej, cechy te mogą ulegać zmianom pod wpływem stresu. Zdecydowanie bardziej wiarygodnym, mimo, że bardziej męczącym sposobem analizy krzywych wzrostu komórek jest wyznaczanie ich na podstawie liczby komórek na jednostkę objętości hodowli. Przy okazji, trudno nazywać krzywą wzrostu wynik przedstawiony na Fig.26 C, skoro komórkom nie dano szansy nawet na 3 podziały. Tak krótki czas prowadzenia doświadczenia nie wystarczy, by zobaczyć efekt auktrofii, co było celem tego doświadczenia, bo na tyle podziałów wystarczają zwykle zapasy wewnątrzkomórkowe.

Powód, dla którego, mimo zdarzających się niedociągnięć, przedstawiona do oceny praca mi się podoba, to specyficzny sposób zadawania pytań o naturę procesów biologicznych i wynikający z tego podejścia logiczny ciąg eksperymentalny. Wychodząc z prostej obserwacji, że poziom ekspresji transporterów glukozy jest zmieniony w szczepach *maf1Δ* i *rpc128-1007* w stosunku do poziomu obserwowanego w szczepie typu dzikiego oraz zależny od źródła węgla dostępnego w podłożu, wysnuto śmiałą hipotezę o zależności metabolizmu komórkowego od dostępności puli tRNA. Następnie, angażując coraz to nowe, w tym globalne technologie, przeprowadzono eksperymenty umożliwiające wykazanie, że istotnie taki związek istnieje. Wskazano, że opiera się on na wzajemnym oddziaływaniu między ścieżkami sygnałowymi przekazującymi informacje o zasobach środowiska, w tym o poziomie glukozy, oraz o potencjale wewnętrznym,

którego markerem jest m.in. poziom dostępności substratów do syntezy białek. Praca przyniosła wiele danych o zmianach zachodzących w metabolizmie węgla, gdy komórki, ze względu na defekt genetyczny, uniemożliwiający płynne dostosowywanie ekspresji genów warunkujących potencjał wzrostowy (tu puli tRNA) do sygnałów zewnętrznych nie są zdolne do prawidłowej reakcji na zmieniający się środowisko. Można tu upatrywać związków ze zmianami zachodzącymi w metabolizmie komórek nowotworowych. Ponadto, praca przyniosła nowe dane o regulacji procesów komórkowych, tak na poziomie efektorów, takich jak transportery glukozy czy enzymy ze szlaków metabolizmu węgla, jak i ich regulatorów, działających na różnych etapach ekspresji genów.

Dyskusja jest wnikliwa i obszerna. Podsumowuje uzyskane wyniki i konfrontuje je z danymi opublikowanymi przez innych badaczy. Dyskusja to zdecydowany atut tej pracy, świadczy nie tylko o dobrej znajomości literatury przedmiotu, ale również o umiejętności krytycznej oceny własnych wyników i umiejętności stawiania dalszych pytań. Słowem Dyskusja świadczy o dojrzałości pani mgr Róży Szatkowskiej jako badacza.

Pani mgr Róża Szatkowska przedstawiła wartościową rozprawę doktorską, prezentującą wyniki przeprowadzonych przez nią badań eksperymentalnych, które umożliwiły wysnucie ważnych z naukowego punktu widzenia wniosków. Doktorantka wykazała się dojrzałością naukową w interpretacji rezultatów serii dobrze przemyślanych eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem bogatej palety szczepów drożdżowych niosących w genomie odpowiednie mutacje bądź konstrukcje, których wprowadzenie umożliwia śledzenie lokalizacji komórkowej białek lub też ich interakcji. Opanowała również bardzo szeroki wachlarz technik, co w rezultacie umożliwiło uzyskanie nowych, istotnych informacji, pozwalając na lepsze zrozumienie powiązań między pozornie odległymi procesami regulacją transkrypcji tRNA i metabolizmem komórkowym. Podsumowując, recenzowana praca w pełni spełnia warunki stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora, określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018r. (z późniejszymi zmianami) Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668).

Gratulując Doktorantce oraz jej pani Promotor uzyskania ważkich wyników, z przyjemnością wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie pani mgr Róży Szatkowskiej do dalszych, przewidzianych przepisami, etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na wartość naukową pracy oraz opublikowanie dużej części wyników w liczących się międzynarodowych czasopismach wnioskuję również o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Stowus