



Warszawa, 21 sierpnia 2023 r

dr hab. Adrianna Skoneczna, prof. instytutu  
Instytut Biochemii i Biofizyki, Polskiej Akademii Nauk  
Pracownia Mechanizmów Stabilności Genetycznej

Sz. Pani  
Prof. dr hab. Maria Rapała-Kozik  
Przewodnicząca Rady Dyscypliny Nauki biologiczne  
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Hanny Tutaj zatytułowanej:**  
**„The rise and fitness effect of chromosomal instability in the budding yeast**  
***Saccharomyces cerevisiae*”**

Rozprawa doktorska Pani mgr Hanny Tutaj zatytułowana „The rise and fitness effect of chromosomal instability in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*” wykonana została na wydziale Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, w Instytucie Nauk o Środowisku, w zespole Genetyki Ewolucyjnej kierowanym przez prof. dr hab. Ryszarda Koronę. Promotorem tej pracy był szef zakładu, Pan profesor Ryszard Korona, a ko-promotorem Pani dr hab. Katarzyna Tomala. Praca jest częścią prowadzonych w zespole badań dotyczących czynników prowadzących do niestabilności genetycznej komórek, z wykorzystaniem pączkujących drożdży jako organizmu modelowego. W przedłożonej do oceny pracy, czynnikami, których wpływ na stabilność genetyczną komórek analizowano były cechy fizyczne genomu oraz zaburzenia równowagi transkrypcyjnej.

Rozprawa doktorska pani mgr Hanny Tutaj jest obszerna, obejmuje: Streszczenie, Wstęp, potraktowane jako trzy kolejne rozdziały dwie publikacje (*Genetics*, 2022 [IF<sub>5\_year</sub> 4.2]; *Current Genetics*, 2019 [IF<sub>5\_year</sub> 2.4]) i jeden manuskrypt udostępniony on-line [<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.03.12.532261v2>], wszystkie prace z wiodącą rolą Doktorantki; oraz Dyskusję. Cel pracy nie został wydzielony, tylko przedstawiony dość obszernie w końcowej partii Wstępu wraz z zarysem eksperymentów przeprowadzonych podczas realizacji projektu doktorskiego, których dokładniejszy opis zawarty jest w kolejno przedstawionych trzech manuskryptach.

W Streszczeniu Doktorantka odnosi się do dwóch pojęć, z którymi czytelnik będzie się stykał przez całą rozprawę doktorską, mianowicie LOH i CIN.

Definiując CIN (ang. chromosome instability) Doktorantka pisze : ”Niestabilność chromosomowa (CIN), definiowana jako zwiększona częstość występowania błędów podczas podziałów komórkowych, ma istotne implikacje dla zdrowia człowieka i procesu starzenia się.”

Nie zgadzam się z tą definicją. CIN to po prostu niestabilność chromosomów. Nazwa nie definiuje przyczyn, konsekwencji ani procesu czy organizmu, których to zjawisko, obserwowane powszechnie w przyrodzie, dotyczy. Niekiedy z CIN mamy do czynienia, ponieważ doszło do nieprawidłowości podczas



podziału komórkowego, ale innym razem z CIN mamy do czynienia, ponieważ doszło do nieprawidłowości podczas replikacji, doszło do uszkodzeń DNA, które nie zostały naprawione lub też ich naprawa doprowadziła do zmian w strukturze chromosomu. Jedyna cecha wspólna mechanizmów prowadzących do CIN, to fakt, że komórki wykazujące te cechy nie zostały usunięte z populacji, zawiodły zatem systemy kontroli jakości lub egzekucja śmierci komórkowej.

Dalej Doktorantka pisze: „W pierwszym rozdziale przedstawiam czynniki genetyczne i środowiskowe, które rozpoznałam jako przyczyniające się do wzrostu utraty heterozygotyczności (LOH), wskazującego na nieprawidłowości w procesie mitotycznego podziału komórkowego.”

I tu ponownie nie mogę się zgodzić. Utrata heterozygotyczności (ang. loss of heterozygosity) niekoniecznie wskazuje na nieprawidłowości w przebiegu mitozy. Utrata heterozygotyczności (LOH), jest definiowana jako utrata jednego z alleli, które o tej heterozygotyczności stanowią. Sama Doktorantka przedstawiając we Wstępie mechanizmy, które mogą prowadzić do LOH, pisze nie tylko o niedoskonałościach mitozy ale i o „nie efektywnej” (należałoby raczej powiedzieć o „wprowadzającej błędy” [ang. error-prone]) naprawie DNA. Zaś na rysunku 1 umieszcza m.in. takie podpisy jak BIR (ang. break-induced replication) czy NHEJ (ang. non-homologous end joining). Przy okazji, na przedstawionym schemacie brak jeszcze dwóch ścieżek rekombinacji prowadzących do zmian w naprawianej sekwencji DNA mogących prowadzić do LOH – SSA (ang. single-strand annealing) oraz MIIR (ang. multi-invasions-induced rearrangements). SSA jest podścieżką rekombinacji homologicznej, wykorzystującą mikrohomologie występujące w pobliżu uszkodzenia DNA, znajdujące się na tej samej nici. Ścieżka rekombinacji nieuprawnionej MIIR wykorzystuje mikrohomologie obecne na różnych chromosomach. Efekty działań tych ścieżek naprawy są różne; pierwsza prowadzi do delekcji, druga do translokacji, dużych rearanżacji chromosomalnych lub do powstania chromosomów o strukturze rozgałęzionej.

Polska wersja streszczenia jest wersją niedoskonałą. Znajdują się tam stwierdzenia, których nie powinno tam być. Nie będę przytaczać ich wszystkich, ale bez wątpienia nie należy pisać: „Oszacowałam też o ile spowalnia się chronologiczne tempo powstawania LOH”, podczas gdy Doktorantka pisze tak naprawdę o zmianach w poziomie LOH podczas chronologicznego starzenia. Tempa zmian nikt w tej pracy nie określa. Nie można pisać o „funkcji genów”, liście „genów zaangażowanych w podział komórkowy” czy jakiegokolwiek inne procesy biologiczne, ani o liście „genów, których nadmiernie obfite produkty destabilizowały genom”. Nie wydaje się też zasadne pisanie o „rozmnażaniu” w kontekście drożdży, zwłaszcza, gdy mowa o proliferacji. Jednak o ile streszczenie napisane w języku polskim zawiera niezręczne sformułowania, o tyle cała praca pisana w języku angielskim czyta się doskonale. Napisana jest poprawną angielszczyzną i z użyciem bogatego słownictwa. Poza kilkoma błędami typu „dampened” zamiast „damped” użyte w kontekście ograniczonej ekspresji grupy genów.

We Wstępie Doktorantka przedstawia w skrócie zagadnienia, z którymi mierzyć się będzie następnie eksperymentalnie. Przedstawia m.in. znane dotychczas przyczyny, wybrane mechanizmy i potencjalne skutki niestabilności chromosomalnej, w szczególności rearanżacji DNA i zmian liczebności chromosomów. Chętnie asocjuje przedstawiane zagadnienia z sytuacjami chorobowymi w komórkach ssaków, zwracając uwagę na istniejące analogie. We Wstępie znajduje się również przegląd wybranych metod stosowanych w badaniach prowadzonych z użyciem komórek drożdży, umożliwiających określenie częstości rearanżacji DNA czy aneuploidii.

Trzy kolejne rozdziały to cykl dwóch publikacji i jednego dostępnego on-line manuskryptu składające się na Wyniki. Kolejno poruszane są tam różne aspekty niestabilności genetycznej drożdży



*Saccharomyces cerevisiae*. W pierwszej z przedstawionych prac analizie poddano wpływ cech fizycznych chromosomów drożdżowych na ich niestabilność mierzona poziomem LOH. Analizowano również wpływ czynników stresowych, w tym głodzenia na tę niestabilność. Stwierdzono zależność częstości LOH od miejsca, w które wstawiono geny markerowe pozwalające na pomiar LOH (1); cech fizycznych rejonu chromosomalnego (2); warunków wzrostu. W drugiej z przedstawionych prac zapytano o to czy silna nadprodukcja białek drożdżowych, osiągana poprzez episomalną ekspresję kodujących je genów spod regulowanego promotora, wpływa na poziom LOH analizowanych szczepów. Stwierdzono, że stała nadprodukcja białek związanych z progresją cyklu komórkowego i podziałami komórkowymi prowadzi do podwyższonego poziomu LOH. Podobny efekt powoduje wysoka ekspresja białek związanych z metabolizmem siarki. Wykazano również, że częstość LOH i mechanizm prowadzący do LOH ulegają zmianom w zależności od źródła węgla w podłożu, przy czym, w szczepach rosnących na galaktozie częstość LOH wzrasta, głównie za sprawą utraty całego chromosomu. W trzeciej z przedstawionych prac analizowano losy diploidalnych komórek drożdżowych monosomicznych pod względem jednego z chromosomów. Stwierdzono, m.in. negatywny wpływ monosomii na wzrost szczepów. Dane transkryptomiczne sugerowały brak wyraźnych różnic w transkrypcji genów zlokalizowanych na chromosomie monosomicznym względem typowego diploida. Obserwowano natomiast efekty kompensacyjne sprowadzające się do zwiększonej ekspresji genów kodujących podjednostki rybosomalne, białka opiekuńcze uczestniczące w fałdowaniu nowo syntetyzowanych białek, a także ograniczenie ekspresji genów kodujących podjednostki proteasomu czy białka opiekuńcze kierujące inne do degradacji. Szczerze mówiąc, to właśnie tę, nieopublikowaną jeszcze pracę uważam za najdonioślejsze osiągnięcie tej rozprawy doktorskiej. Wykorzystanie nieoczekiwanego wyniku otrzymanego przy okazji poprzednio prowadzonych prac do stworzenia unikalnego narzędzia badawczego, pozwalającego na eksplorację całkiem nowego aspektu niestabilności genetycznej komórek, uważam za cechę definiującą prawdziwego badacza. Dostrzeżenie uchylonych drzwi i wyjście przez nie na całkowicie nieznane terytorium jest zdecydowanie mniej bezpieczne niż „rewizytowanie” znanych rejonów (choćby i w sposób lepiej zorganizowany niż robiono to uprzednio) czy niż proste odwrócenie warunków progowych eksperymentu (badano brak lub niedomiar, zapytajmy co się stanie gdy mamy do czynienia z nadmiarem). Aby podjąć się takiego zadania trzeba już odwagi dojrzałego badacza. Wyniki tego eksperymentu nagradzają za podjęte ryzyko. Wykryto m.in. niemożność stabilnego usunięcia chromosomów VII i XIII. A to zachęca do uchylenia kolejnych drzwi... Ta droga, jak wiadomo, nie ma końca, ale życzę Pani mgr Hannie Tutaj i całemu zespołowi bezpiecznej możliwości kontynuacji badań.

W Dyskusji mgr Hanna Tutaj troszkę inaczej niż zrobiono to w Dyskusji poszczególnych publikacji powstałych podczas realizacji badań, komentuje uzyskane wyniki na tle literatury przedmiotu, wykazując, że porusza się w tej dziedzinie dosyć swobodnie.

O wysokim poziomie przygotowania mgr Hanny Tutaj do pracy badawczej świadczy detaliczność przedstawionych procedur eksperymentalnych, ilość wyników i sposób opracowania uzyskanych danych, przy czym na szczególną uwagę zasługuje bogactwo zastosowanych metod statystycznych. O ile sposób analizy otrzymanych danych zasługuje na uznanie, w sposobie planowania doświadczeń można dopatrzeć się uchybień. Jednym z nich jest zastosowanie w pierwszej w z przedstawionych prac testu pomiaru poziomu LOH w analizowanych szczepach, w sposób, który uniemożliwia uzyskanie wiarygodnych wyników. Po pierwsze, prowadzi do generowania wyniku 0 dla większości z powtórzeń biologicznych, dla niektórych z badanych szczepów. Po drugie, uniemożliwia zastosowanie mediany w dalszej analizie, co w przypadku testów mutagenyzy wyprzedzającej, a locus *URA3* wraz z selekcją na 5-FOA do takich należy, jest kluczowe. Zdaję sobie sprawę, że inny sposób wykonania eksperymentu na tej liczbie



szczepów, zwiększający objętość analizowanych hodowli i zmniejszający gęstość wysiewu, co umożliwiłoby wzrost wystarczającej liczbie klonów, generowałby wiele dodatkowej pracy. Doceniam też uczciwe postawienie sprawy w sekcji metodycznej. Nie zmienia to jednak faktu, że uzyskane wyniki tracą przez to na wiarygodności.

Problematyczne wydaje się również zastosowanie, do uzyskania zwiększonej produkcji białek, kolekcji szczepów MORF. Składa się na to zarówno tło genetyczne, nie dające drożdżom szansy wzrostu na podłożu gwarantującym indukcję promotora *GAL1p* (o czym wspominają sami autorzy tej pracy), jak również zastosowanie, zamiast genów, fuzji genowych, co wpływa nie tylko na funkcje kodowanych przez te geny białek, ale również na trwałość zarówno transkryptów jak i białek hybrydowych oraz potencjalnie zaburza lokalizację komórkową produktów. Co więcej, o wielu białkach znanych ze swojej lokalizacji jądrowej wiadomo, że ich sygnały lokalizacji jądrowej znajdują się na C-końcu białka. Zatem, już na wstępie eksperymentu świadomie odcięto możliwość wychwycenia wielu zależności.

Swobodny sposób przedstawiania zagadnień związanych z tematyką badawczą oraz sposób prowadzenia dyskusji otrzymanych wyników potwierdza bardzo dobry poziom pracy naukowej mgr Hanny Tutaj, a także świadczy o wysokiej jakości środowiska naukowego w którym ten doktorat był tworzony. Szkoda, że środowisko to nie uczy również doceniania i cytowania prac badawczych powstałych w innych laboratoriach w kraju, dotyczących zbliżonych zagadnień i równie pomocnych w interpretacji danych jak cytowane wyniki badań wykonanych w laboratoriach zagranicznych.

Badania przedstawione w tej rozprawie doktorskiej, ze względu na ich przesiewowy charakter, stwarzają szerokie pole do dyskusji. W związku z tym, prosiłabym Doktorantkę do ustosunkowania się do wymienionych poniżej kwestii związanych z przedstawionymi wynikami, ich interpretacją oraz doбором metod eksperymentalnych. Pytania/uwagi dotyczą kolejnych wątków tematycznych poruszanych w rozprawie.

## Rozdział I:

1. Jaki był klucz doboru szczepów rodzicielskich do doświadczenia?
2. Jak Doktorantka tłumaczy różnice w poziomach LOH obserwowane w przygotowanych przez nią szczepach, np. między szczepami 10R w tle BY/BY, BY/JM975 i BY/ UWOPS05-227.2; 4R w tle BY/BY, BY/JM975 i BY/ UWOPS05-227.2; lub 12R w tle BY/BY, BY/JM975 (Fig. 2), jak również różnice obserwowane między szczepami 14R w tle BY/JM975 i BY/ UWOPS05-227.2; lub 6L w tle BY/BY i BY/ DBVPG6044 (Fig.3)?
3. Jak Doktorantka tłumaczy różnice w poziomach LOH liczonych na podstawie klonów rosnących na podłożu z 5-FOA + G-418 albo na podłożu z 5-FOA? Dlaczego te różnice obserwowane są tylko dla pojedynczych szczepów (np. 14R i 1L w tle BY/JM975)?
4. Czy istnieją różnice w długości poszczególnych chromosomów lub w organizacji przestrzennej genów na poszczególnych chromosomach pomiędzy użytymi w doświadczeniach szczepami o różnym tle genetycznym? Jaki mogą mieć wpływ na wyniki uzyskane dla szczepów hybrydowych?
5. Czy zdaniem Doktorantki liczba genów niezbędnych do życia zlokalizowanych na danym chromosomie może korelować z częstością LOH obserwowaną w analizowanych szczepach?
6. W dyskusji wyraźnie brakuje odniesień do prac związanych z wpływem DSB na poziom LOH. Znane są t.zw. 'gorące miejsca' DSBs występujące spontanicznie w genomie drożdży [Biernacka i in. *Commun. Biol*, 2018]. Czy zdaniem Doktorantki obecność tych miejsc w genomie wpływa na poziom LOH w badanych przez nią szczepach?



7. Prosiłabym też o skomentowanie własnych wyników w kontekście wyników przedstawionych w pracy [Agmon i in. *Nat Cell Biol.* 2013].
8. Jaki był klucz doboru stresów, których wpływ na poziom LOH analizowano?

Uwagi metodyczne:

- 1) W pracy brak genotypów analizowanych szczepów.

(Nawiasem mówiąc, czy na pewno mowa o szczepie DBPVG6044, a nie DBVPG6044; w pracy [Cubillos i in. 2009] nie ma mowy o pierwszym, a jest o drugim.)

- 2) W podłożu minimalnym jest wiele siarczanów, w tym siarczan amonu będący dla drożdży źródłem azotu. Genetycyna (G-418) jest sprzedawana jako siarczan, co sprawia, że antybiotyk konkuruje o transportery ze związkami znacznie dostępniejszymi w podłożu (siarczan amonu 5 g/l [ $\sim 38$  mM]; siarczan magnezu 500 mg/l [4 mM], siarczan manganu 0,4 mg/l, itd.) versus G-418 (400 mg/l; 692.7 g/mol [0,577 mM]). Zatem konkurencja innych cząsteczek w podłożu do G-418 to ok. 72,4:1. Trudno się w takich warunkach spodziewać ścisłej selekcji, nawet używając czterokrotnie wyższego stężenia G-418 niż stosowane zazwyczaj w podłożu pełnym (100 mg/l).

- 3) Prowadzenie doświadczenia, analizującego poziom LOH w starzejących się komórkach, w 200  $\mu$ l objętościach w szalkach titracyjnych, uwzględniając śmiertelność głodzonych szczepów, czterokrotne pobieranie 2 x 10  $\mu$ l (+/- błąd pipetowania) oraz inkubację w dość wysokiej temperaturze, oznacza w istocie stopniowe wysychanie, a zatem i zagęszczanie tych hodowli.

Z jednej strony, to wyjaśnia dlaczego dla niektórych szczepów po 21 dniach głodzenia obserwowano większą przeżywalność niż na początku eksperymentu. Z drugiej strony, należy oczekiwać różnic w poziomach LOH między szczepami, które hodowane były we wnętrzu szalki, a tymi hodowanymi na jej obrzeżach. Stąd moja prośba o bardziej szczegółowy techniczny opis przebiegu doświadczenia. Jak rozumiem wariant z płytkami tritacyjnymi wybrano w celu ułatwienia prowadzenia doświadczeń z dużą liczbą szczepów. Czy zadbano o randomizację ich układu na szalkach w obrębie jednego i pomiędzy powtórzeniami biologicznymi?

## Rozdział II

1. Użycie kolekcji MORF w doświadczeniu opisanym w tej pracy budzi szereg wątpliwości. Kolekcja ta została stworzona, by ułatwić oczyszczanie białek i ich późniejsze analizy biochemiczne. Abstrahując od нефизjologicznego poziomu białek nadprodukowanych w komórkach drożdży w warunkach indukcji, mamy tu do czynienia z problemem nadprodukcji białka hybrydowego. Białko hybrydowe niekoniecznie zachowuje funkcje molekularne białka natywnego, może mieć zmienioną lokalizację komórkową, trwałość, podlegać innym modyfikacjom, tracić zdolność oddziaływania z innymi molekułami. Ponadto, zastosowanie promotora *GAL1p* implikuje konieczność indukcji promotora poprzez zmianę źródła węgla, co niesie ze sobą zmianę ekspresji przeszło trzystu genów, oraz powoduje szereg innych zmian organizacyjnych wewnątrz komórki, m.in. dotyczących zmian priorytetów w organizacji transportu, translacji, degradacji czy dojrzewania białek.
- Czy Doktorantka sprawdziła, używając innego systemu ekspresji i natywnych alleli, czy obserwowane fenotypy zwiększonego poziomu LOH istotnie wynikają z nadprodukcji wskazanych w doświadczeniu przesiewowym białek?
2. Skąd, zdaniem Doktorantki, bierze się różnica w częstości utraty chromosomu V stwierdzona dla komórek rosnących na różnych źródłach węgla?
3. Wyniki eksperymentalne wskazują na uwikłanie białek, zaklasyfikowanych jako uczestniczące w procesie metabolizmu siarki, w utrzymywaniu stabilnego genomu. W pracy przedstawiono hipotezę o



podwyższonym ROS jako źródle LOH. Mnie ta hipoteza nie przekonuje. Źródłem moich wątpliwości jest fakt, że np. w szczepie nadprodukującym białko Lsc2 wykazano ok. 4-krotny wzrost ROS, gdy tymczasem w szczepie tym odnotowano ponad 650-krotny wzrost częstości LOH.

Jakie inne hipotezy tłumaczące obserwowane fenotypy można zaproponować?

4. W pracy podkreśla się znaczenie dla cyklu komórkowego białek związanych z metabolizmem  $\beta$ -glukanów, a pośrednio również z punktem kontrolnym CWI, wśród których zostały wymienione Kre8 (powinno być Kre9), Msn1, Pcl8 i Upg1. Czy wpływu nadprodukcji Msn1 na wzrost LOH nie należy upatrywać raczej w regulacji przez ten czynnik transkrypcyjny ekspresji takich genów jak *MUS81* czy *FIT3*?

Uwagi metodyczne:

- 1) Na rysunku 1 przedstawiającym schemat doświadczenia oraz w towarzyszących mu opisach zaznaczono, że po indukcji ekspresji endonukleazy Ho w szczepie Y258 (*MATa*) otrzymano diploida, którego następnie „wyleczono” z plazmidu pHO i poddano sporulacji. Nie wspomniano jednak o sposobie elekcji diploidów. Zwykle indukcję endonukleazy Ho stosuje się w celu zmiany typu płciowego drożdży, a dopiero otrzymane haploidy o przeciwnym typie płciowym krzyżuje się z wybranym szczepem w celu uzyskania diploida. Jak robiono tym razem?  
Czy przeprowadzono analizę zawartości DNA otrzymanych szczepów, a przynajmniej szczepu „universal mater”?  
Schemat byłby bardziej czytelny gdyby uwzględniono różnice morfologii pomiędzy haploidami a diploidami.
- 2) Jak Doktorantka tłumaczy fakt, że tylko 40% szczepów wykrytych w teście przesiewowym LOH powtórzyło fenotyp podczas indywidualnej weryfikacji fenotypu?
- 3) Jaki rodzaj wolnych rodników jest wykrywany w barwieniu z użyciem CellROX Deep Red dye?

### Rozdział III

1. Jaki, zdaniem Doktorantki, jest powód, że chromosomy VII i XIII ulegają endoduplikacji niemal natychmiast po ich utracie?
2. Przeprowadzone doświadczenia analizy transkryptomów szczepów monosomicznych doprowadziły do wniosku, że istnieje szereg wspólnych mechanizmów kompensacyjnych. Prosiłabym o skomentowanie tych mechanizmów w kontekście wyników (Jung i in., *BMC Genomics*, 2011).

Uwagi metodyczne:

- 1) Rysunek 1b przedstawia zawartość poszczególnych rejonów genomu drożdży w analizowanych metodą sekwencjonowania cało-genomowego poszczególnych szczepach monosomicznych. Wynik uzyskany dla szczepu M16 sugeruje liczne zmiany towarzyszące monosomii chromosomu XVI. Ponieważ w tekście rozprawy nie znalazłam odniesienia do tego wyniku, poproszę o komentarz.
- 2) Czy Doktorantka uważa określanie tempa wzrostu metodą wykorzystującą TECAN Infinite (nie ‘Infinity’) reader za wiarygodną, w przypadku, gdy analizuje się wzrost stosunkowo ciężkich i łatwo opadających komórek drożdży?  
Czy określanie tempa wzrostu w oparciu o pomiary OD<sub>600</sub> jest metodą wiarygodną?  
Jakie mogą być przyczyny artefaktów uzyskiwanych tą metodą pomiaru? Czy istnieje alternatywna metoda określania tempa wzrostu?
- 3) W sekcji „Epistasis for fitness” Doktorantka pisze „Regarding the yeast growth rate, effectively none of single gene deletions can make it faster (Sliwa and Korona, 2005).” Ponieważ nasze własne



obserwacje nie zgadzają się z tym stwierdzeniem, zajrzałam do cytowanej pracy, gdzie pod koniec wstępu widnieje zdanie: „Finally, using newly prepared and strictly isogenic constructs, we determined that only about a dozen of the yeast gene deletions were slightly advantageous.” Skąd wynikała ta niezgodność? Obie prace pochodzą z tego samego zespołu.

Czy zdaniem Doktorantki inne podejście eksperymentalne walidujące tempo wzrostu szczepów z kolekcji delecyjnej, może prowadzić do uzyskania odmiennych wyników? Mam tu na myśli nie tylko inny technicznie sposób oceny wzrostu ale np. przeprowadzenie eksperymentu przez analizę wzrostu równoległego *versus* równoczesnego (hodowle na szalkach titracyjnych lub replikach *versus* wykorzystanie techniki genetycznych kodów kreskowych).

- 4) W sekcji 2.2 Materiałów i Metod (str. 82) Doktorantka opisując sposób doboru kolonii do dalszych badań pisze: „Colonies identified in this way were often of different sizes suggesting that they were genetically heterogeneous.” Po pierwsze, jeśli mutacja ma wpływ na tempo wzrostu, to nie znaczy, że każda kolonia, w której doszło do zmiany będzie miała ten sam rozmiar, choćby dlatego, że do zmiany mogło dojść w różnym czasie. Po drugie, z problemem „małych” i „dużych” kolonii zetknął się niemal każdy badacz pracujący z mikroorganizmami przez kilka lat i w każdym niemal przypadku wyjaśnienie tego fenomenu było inne. Co więcej, często pasaż małej kolonii prowadzi do powstania zarówno małych jak i dużych kolonii potomnych. Podobnie jest z pasażem dużych kolonii. Na tej podstawie wiele nie można wnosić. W przypadku, gdy obiektem badań jest szczep BY4743, dochodzi jeszcze problem częstej spontanicznej utraty mtDNA (za którą odpowiada kilka mutacji obecnych w genomie tego szczepu), a co za tym idzie również problem niestabilności genetycznej komórek.
- 5) Co dokładnie ma Doktorantka na myśli pisząc w Dyskusji pracy: „Our findings align with the prevailing conviction that transcriptional compensation in aneuploidy is rare, if it occurs at all (Hughes et al., 2000; Torres et al., 2007, 2016).”?

W swojej pracy Hughes pisze: „data show that the mRNA abundance of **nearly** every gene on trisomic or monosomic chromosomes is altered, suggesting that in yeast there is no global dosage-compensation mechanism to normalize expression from each gene (or chromosome).” Przy czym, kluczowe jest słowo „nearly”. Z moich własnych doświadczeń wynika, że choć ekspresja genów zlokalizowanych na chromosomie, którego duplikacja kompensuje utratę kluczowego dla życia genu, to jednak ekspresja pojedynczych genów (w tym genu supresorowego zlokalizowanego na tym chromosomie) wyraźnie odstaje od przeciętnej.

Czy w wynikach otrzymanych przez Doktorantkę widać tego typu zdarzenia?

Czy można wskazać inne mechanizmy kompensacji niskiego poziomu transkrypcji genów zlokalizowanych na niedoreprezentowanym chromosomie, które wyjaśniałyby brak konieczności podbijania ekspresji tych genów na poziomie transkrypcji? Wyniki Doktorantki dotyczące szczepu M7 i M13 wskazują, że ograniczona ekspresja genów zlokalizowanych na danym chromosomie nie zawsze jest dopuszczalna.

Podsumowując, pomimo pewnych słabości metodycznych wyrażonych w tej recenzji, których jednak trudno uniknąć prowadząc badania przesiewowe, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Hanny Tutaj stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Co więcej, poruszana w tej rozprawie doktorskiej tematyka choć niezwykle atrakcyjna jako problem do rozwiązania, jest również trudna technicznie w badaniach, ze względu na niestabilność genetyczną samych obiektów badań. Potrzeba nie tylko ciekawości naukowej i wiedzy przedmiotu, ale również silnej

determinacji i konsekwencji, by tego rodzaju badania prowadzić. Doktorantka najwyraźniej wszelkie potrzebne do tej pracy talenty posiada. Prezentuje też zdolności konieczne do samodzielnego prowadzenia badań naukowych, takie jak umiejętność stawiania nowych pytań czy zdolność krytycznego osądu własnych wyników. Doktorantka wykazuje również wiedzę ogólną w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinie nauki biologiczne. Tym samym, wszelkie wymagania stawiane Kandydatom i zawarte w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365; z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228; z 2011 r. Nr 84, poz. 455) zostały spełnione. Dlatego zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Hanny Tutaj do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinie nauki biologiczne.

Z poważaniem,



Adrianna Skoneczna