

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

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Hanny Tutaj została wykonana pod kierunkiem Pana Prof. dr hab. Ryszarda Korony oraz z udziałem Promotora pomocniczego Pani dr hab. Katarzyny Tomali w Instytucie Nauk o Środowisku Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Badania opisane w pracy doktorskiej zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektów nr 2013/11/B/NZ2/00122, 2014/13/B/NZ8/04668 oraz 2017/25/B/NZ2/01036. Dodatkowo badania były finansowane z grantu UJ nr S/MND/WB/INoS/10/2018.

Problematyka pracy doktorskiej koncentruje się na poznaniu przyczyn i konsekwencji niestabilności chromosomowej związanej z utratą heterozygotyczności (ang. *loss of heterozygosity* LOH) komórek drożdży piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae*. Należy jednak zaznaczyć, że tematyka pracy doktorskiej ma wymiar uniwersalny, ponieważ pozwala lepiej zrozumieć fundamentalne procesy leżące u podstaw utrzymania stabilności chromosomów wszystkich organizmów eukariotycznych, w tym człowieka. Na podkreślenie zasługuje również fakt, że jak dotąd przyczyny oraz konsekwencje zaburzeń chromosomowych nie są wciąż dobrze poznane. W szczególności, w tym aspekcie interesujące jest zagadnienie dotyczące określenia znaczenia retrotranspozonów, sekwencji centromerowych, rDNA czy sekwencji telomerowych w utrzymaniu prawidłowej struktury chromatyny chromosomów. Recenzowana praca doktorska dostarcza także nowych informacji dotyczących zagadnień związanych z określeniem wpływu nieletalnych mutacji genów kontrolujących szlaki metaboliczne na częstość i wierność naprawy DNA oraz stabilność chromosomową. Jest to tym bardziej istotne, że część aberracji chromosomowych może rozprzestrzeniać się w obrębie populacji. Tematyka ta jest również ważna z punktu widzenia nie tylko badań podstawowych, ale również aplikacyjnych, gdyż dotyczy ogólnych mechanizmów adaptacji genetycznej komórek eukariotycznych do warunków stresu. Z tego powodu problematyka pracy doktorskiej

ma bezpośrednie znaczenie dla przemysłu biotechnologicznego wykorzystującego drożdże jako surowiec. Dodatkowo poznanie znaczenia wpływu na stabilność chromosomową mutacji genów posiadający swoje homologii wśród genów innych gatunków może pomóc w zrozumieniu także mechanizmów lekooporności różnych patogennych oportunistycznych grzybów. Co ciekawe, tematyka podjęta przez Doktorantkę ma znaczenie również dla onkologii, ponieważ otrzymane wyniki mogą udzielić odpowiedzi na pytania dotyczące przyczyn zmienności klonalnej komórek nowotworowych związanej z powstawaniem wtórnych aberracji chromosomowych.

Zgodnie z powyższym należy stwierdzić, że tematyka pracy doktorskiej jest aktualna, interesująca oraz mająca uzasadnienie w odniesieniu do dostępnych publikacji naukowych.

Ocena formalna pracy

Rozprawa doktorska została przygotowana w języku angielskim, co uważam za walor w zakresie jej dostępności również dla czytelników zagranicznych.

Rozprawę doktorską Pani mgr Hanny Tutaj stanowi zbiór 2 artykułów naukowych opublikowanych w latach 2019-2022 w recenzowanych zagranicznych czasopismach znajdujących się w aktualnym wykazie czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych MEiN. Są to następujące prace:

- 1) **Tutaj H**, Pirog A, Tomala K, Korona R. *Genome-scale patterns in the loss of heterozygosity incidence in *Saccharomyces cerevisiae**. Genetics. 2022 May 5;221(1):iyac032. doi: 10.1093/genetics/iyac032_.
- 2) **Tutaj H**, Pogoda E, Tomala K, Korona R. *Gene overexpression screen for chromosome instability in yeast primarily identifies cell cycle progression genes*. Curr Genet. 2019 Apr;65(2):483-492. doi: 10.1007/s00294-018-0885-x. Epub 2018 Sep 22. Erratum in: Curr Genet. 2018 Oct 16.

Dodatkowo do cyklu prac włączono manuskrypt tzw. *preprint* autorstwa **Hanny Tutaj**, Katarzyny Tomali, Ryszarda Korony zatytułowany “*Epistasis supports viability under extensive gene-dose insufficiency following chromosome loss*”. Manuskrypt został opublikowany w bazie Biorxiv i jest dostępny pod adresem <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.03.12.532261> v2.



Prezentacja zbioru artykułów została poprzedzona streszczeniem w języku angielskim oraz polskim, wstępem, a zakończona dyskusją oraz spisem literatury wykorzystanej do przygotowania wstępu i dyskusji.

Każdy z wyżej wymienionych artykułów oraz manuskrypt zawiera również dodatkowe dane opracowane w postaci tzw. *supplementary materials*. Do każdego artykułu oraz manuskryptu pracy dołączono oświadczenia współautorów z opisem udziałów wszystkich współautorów wraz z podaniem udziału % poszczególnych współautorów w powstawaniu wymienionych prac badawczych.

Wszystkie artykuły stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej to prace prezentujące wyłącznie oryginalne wyniki eksperymentalne, w których Doktorantka zajmuje miejsce pierwszego wiodącego autora. Wiodący udział Pani mgr Hanny Tutaj w powstawaniu tych prac potwierdzają także złożone oświadczenia.

Udział Pani mgr Hanny Tutaj w powstaniu każdej z publikacji polegał m.in., na opracowaniu koncepcji pracy naukowej, opracowaniu metodyki, zebraniu materiałów, wizualizacji wyników, analizie i interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu, redagowaniu manuskryptu. Biorąc powyższe, chciałbym podkreślić, że recenzent nie ma wątpliwości co do wiodącego udziału Doktorantki w powstaniu prac będących podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia doktora. Udział pozostałych współautorów jest spójny z deklaracją Doktorantki w zakresie jej wiodącej roli jako autora w pracach badawczych stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej.

Należy jednak zwrócić uwagę na formę oświadczeń, ponieważ Doktorantka oraz współautorzy dołączyli informację o swoim udziale % w powstaniu z każdej z prac. Chciałbym zaznaczyć, że jest to zbędne, ponieważ jest obarczone dużym i sztucznym szacunkiem. Dla przykładu, w jaki sposób Doktorantka w pracy zatytułowanej „*Epistasis supports viability under extensive gene-dose insufficiency following chromosome loss*” oszacowała swój udział. na poziomie 45%? Jaką metodologię zastosowano do wyliczenia tego udziału? Należy mieć na uwadze, że lepszym rozwiązaniem jest zawsze precyzyjny opis merytoryczny (a nie procentowy) wkładu w powstanie każdej pracy (np. autorka wyników zaprezentowanych na rysunku nr x).

Recenzent zdaje sobie sprawę z nakładu pracy laboratoryjnej oraz skali podjętych badań, dlatego w pełni rozumie, że niejednokrotnie jedna rycina w tym przypadku może integrować dane również otrzymane przez pozostałych współautorów. Recenzent nie ma

zastrzeżeń do tego faktu, ponieważ zgodnie wszyscy współautorzy zadeklarowali wiodący udział Doktorantki w tych pracach badawczych.

Inną drobną uwagą jest zawarta informacja w oświadczeniach Doktorantki i niektórych współautorów, że „przeprowadzili proces recenzji”. Jest to niefortunne stwierdzenie, ponieważ sugeruje, że autorzy sami oceniali swoją pracę naukową. Z pewnością tak jednak nie było mając na uwadze renomę czasopism *Genetics* oraz *Current Genetics*. Kolejnym drobnym „przeoczeniem” w treści deklaracji jest fakt braku stwierdzenia „udziału w wykonaniu eksperymentów”. Takiego stwierdzenia nie ma także w pozostałych deklaracjach dlatego recenzent domniema, że jest ono zawarte w „zbieraniu materiałów” lub „analizie wyników” lub „opracowaniu metodyki”. Wskazane byłoby doprecyzowanie tego podczas publicznej obrony pracy doktorskiej.

Ocena merytoryczna pracy

Wstęp pracy został bardzo dobrze opracowany jako wprowadzenie do zagadnień będących tematem publikacji naukowych oraz manuskryptu. We wstępie Doktorantka opisała między innymi zagadnienia dotyczące niestabilności chromosomowej i przedstawiła aktualny stan wiedzy dotyczący mechanizmów utraty heterozygotyczności, wykorzystanie modeli komórek drożdży w badaniach niestabilności chromosomowej oraz przedstawiła założenia teoretyczne dotyczące zastosowanej metodyki. Wstęp został wzbogacany w dobrze przygotowane schematy. Dodatkowo Doktorantka w oparciu o przegląd literatury uargumentowała również przyczyny podjęcia własnych badań. Końcowy podrozdział wstępu zawiera opis przedmiotu badań wraz z hipotezami oraz sformułowanymi pytaniami, na które Doktorantka chciała udzielić odpowiedzi podczas wykonywania swojej pracy doktorskiej.

Cel pracy został określony w sposób jednoznaczny zgodnie z tematem rozprawy. Dodatkowo Doktorantka sprecyzowała trzy cele szczegółowe. Głównym celem pracy była kompleksowa charakterystyka spontanicznej utraty heterozygotyczności w odniesieniu do lokalizacji zmian w obrębie chromosomów oraz czynników zewnętrznych, tj. obecności lub braku składników pokarmowych. Do tej części również nie mam uwag.

Podsumowując powyższe stwierdzam, że postawiony cel naukowy spełnia wymóg niezbędny dla uznania ocenianej pracy doktorskiej za odpowiadający poziomowi jakim powinna odznaczać się praca doktorska, ponieważ realizacja tego celu istotnie prowadzi do poszerzenia dotychczasowej wiedzy oraz stanowi przyczynek do oryginalnego rozwiązania problemu naukowego.

Ponieważ dwie prace będące podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia doktora były już poddane wnikliwym recenzjom przez ekspertów czasopism naukowych, recenzent chciałby wskazać tylko na wybrane aspekty każdej z tych prac, które jego zdaniem są istotne dla prowadzonego postępowania.

W artykule zatytułowanym „*Genome-scale patterns in the loss of heterozygosity incidence in *Saccharomyces cerevisiae**”, Doktorantka prezentuje szereg ważnych wniosków wskazując między innymi, że: LOH dotyczyła częściej regionów znajdujących się w ramieniu krótkim chromosomów, utrata heterozygotyczności może zachodzić także w komórkach dzielących się (poddanych głodzeniu), częstość LOH była zależna do lokalizacji regionów w odniesieniu do centromeru oraz telomerów, a także, że elementy powtarzalne genomu, takie jak sekwencje autonomicznie replikujące się (ARS) i retrotranspozony, dodatkowo zwiększały częstość pojawiania się LOH.

Z kolei artykule zatytułowanym „*Gene overexpression screen for chromosome instability in yeast primarily identifies cell cycle progression genes*” skoncentrowała swoje badania na identyfikacji genów wpływających na częstość chromosomowej niestabilności. Do tego celu zastosowała > 5100 diploidalnych szczepów z plazmidami umożliwiającymi wysoką ekspresję pojedynczych genów połączonych z indukowalnym promotorem *GAL1*. Po czym wykonała screening w celu określenia, których genów nadekspresja prowadziła do zwiększenia LOH oraz utraty chromosomów. W trakcie swojej pracy Doktorantka wytypowała kilka genów, których nadekspresja nasilała efekt LOH. Wśród wytypowanych genów dominowały geny zaangażowane w regulację podziału komórki, ale także w metabolizm związków siarki.

W manuskrypcie zatytułowanym „*Epistasis supports viability under extensive gene-dose insufficiency following chromosome loss*” Doktorantka ukierunkowała własne badania na analizę efektów biologicznych związanych ze zjawiskiem monosomii. W pracy tej wykazała, że u drożdży w odniesieniu do niektórych chromosomów niedobór jednej kopii chromosomu może być rekompensowany nie nadekspresją genów chromosomu homologicznego, a dostosowaniem, związanym z epistazą prowadzącą do zmian metabolizmu komórkowego, ograniczając w ten sposób negatywne skutki monosomii i utraty genów.

Forma prezentacji wyników we wszystkich pracach oraz ich opis został usystematyzowany w sposób tworzący logiczny ciąg zmierzający do udzielenia odpowiedzi na zdefiniowane w artykułach oraz pracy doktorskiej cele.

W związku z powyższym należy stwierdzić, że wszystkie załączone prace stanowią spójny tematycznie zbiór artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych określanych przez ministra właściwego do spraw nauki, tym samym warunek ustawy jaki powinna spełniać praca doktorska w tym zakresie należy uznać za spełniony.

Podsumowując, recenzent ocenia bardzo dobrze wartość merytoryczną wszystkich artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Należy zaznaczyć, że otrzymane wyniki podlegały rygorystycznym procedurom specjalistycznej recenzji zewnętrznej oraz przez członków rad redakcyjnych, w których zostały opublikowane. Z kolei dołączony manuskrypt w formie *preprintu*, również zawiera nieopublikowane wyniki, które recenzent ocenił również bardzo wysoko względem ich znaczenia dla rozwoju nauki i dyscypliny nauki biologiczne.

Należy zaznaczyć, że opis wykorzystanych układów eksperymentalnych oraz zastosowanych technik we wszystkich pracach stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej został dokonany z należytą starannością i pozwala na dokładne prześledzenie wszystkich etapów przeprowadzonych eksperymentów. Zastosowane metody zostały odpowiednio dobrane i użyte zgodnie z przyjętymi standardami. Opisane metody pozwoliły zatem na zweryfikowanie hipotezy badawczej oraz osiągnięcia zdefiniowanych przez Doktorantki celów pracy doktorskiej. Jakość merytoryczna prac oraz zastosowane metody do ich wykonania świadczą o bardzo dobrym warsztacie Doktorantki oraz bardzo dużej wiedzy Pani mgr Hanny Tutaj.

W związku z brakiem uwag krytycznych do części merytorycznej mam na koniec tylko kilka pytań do Doktorantki wynikających z ciekawości recenzenta z jednoczesną prośbą o odniesie się do nich podczas publicznej obrony niniejszej pracy doktorskiej.

Czy Doktorantka dostrzega jakieś słabe strony zastosowanej metodyki służącej określaniu częstości LOH w szczepach komórek drożdżowych? Czy tą metodą można wykryć wszystkie typy aberracji chromosomowych?

W jaki sposób Doktorantka monitorowała stabilność szczepów dzikich WT, do których odnosiła swoje wyniki?

Czy Doktorantka posiada informacje dotyczące długości telomerów oraz rDNA u mutantów badanych szczepów? Czy istnieje korelacja między LOH a np. ilością/długością sekwencji powtarzalnych?

Czy Doktorantka dopuszcza możliwość istnienia fragmentów acentrycznych w obrębie badanych mutantów? Jeżeli tak, czy mogą mieć one znaczenie dla otrzymanych wyników?

W jednej ze swoich prac Doktorantka opisała, że galaktoza prowadzi do LOH tylko wtedy, gdy obecny jest plazmid MORF (ang. *moveable* ORF - 2 μ plazmid z markerem *URA3*), w związku z czym proszę o wyrażenie opinii czy zdaniem Doktorantki stosowanie podczas różnych procedur laboratoryjnych sztucznych pozachromosomowych zdolnych do replikacji fragmentów DNA może wpływać na stabilność genetyczną szczepów laboratoryjnych?

Wniosek końcowy

W podsumowaniu recenzji stwierdzam, że przedłożona do oceny praca doktorska Pani mgr Hanny Tutaj spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim opisane w artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595; z dnia 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z dnia 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455), ponieważ Doktorantka udowodniła, że samodzielnie potrafi rozwiązywać sformułowany problem naukowy poprzez odpowiednio zaplanowane eksperymenty, ich interpretację, krytyczną dyskusję oraz wyważone wnioski. Praca doktorska istotnie poszerza dotychczasową wiedzę w dyscyplinie nauki biologiczne. W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Hanny Tutaj do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość naukową wyników oraz opublikowane prace w bardzo dobrych czasopiśmie naukowych wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o wyróżnienie ocenianej przeze mnie rozprawy doktorskiej.

Rzeszów, 28/07/2023

Dr hab. Maciej Wnuk, prof. UR

