

**Formularz recenzji rozprawy doktorskiej
Rada Dyscypliny Nauki biologiczne
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie**

Imię i nazwisko kandydata: Adrian Piróg

Tytuł rozprawy doktorskiej: Powstanie złożonych rearanżacji genomu w modelowym organizmie eukariotycznym *Saccharomyces cerevisiae*

Promotor: prof. dr hab. Ryszard Korona

Promotor pomocniczy: dr hab. Katarzyna Tomala

Recenzent: prof. dr hab. Jarosław Marszałek (Uniwersytet Gdański)

1. Tematyka rozprawy

czy tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy zagadnień istotnych dla rozwoju dyscypliny nauki biologiczne (sugerowane ok. 50-150 słów):

Tempo powstawania pojedynczych i wielokrotnych rearanżacji genomu to istotny problem biologiczny. Wynika to z faktu, że w przypadku zarówno komórek nowotworowych jak też jednokomórkowych organizmów ewoluujących w nowym środowisku obserwowane są rearanżacje genomowe takie jak delecje fragmentów i całkowite utraty chromosomów. Sugeruje to, że rearanżacje genomowe mają znaczenie dla rozwoju nowotworu oraz dostosowania komórek do środowiska. Niewiele jednak wiadomo na temat mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za te rearanżacje oraz czy zachodzą one niezależnie czy też są ze sobą powiązane w tym sensie, że częstość wielokrotnych rearanżacji jest większa niż iloczyn częstości rearanżacji pojedynczych. Innymi słowy czy mechanizmy molekularne odpowiedzialne za te zjawiska indukują pojedyncze niezależne rearanżacje czy też raz zainicjowany proces skutkuje wielokrotnymi rearanżacjami. To istotne biologicznie pytania, na które odpowiada doktorant w ocenianej rozprawie.

W badaniach zastosował drożdże piekarnicze, które umożliwiają precyzyjne manipulacje genetyczne niedostępne dla innych modelowych organizmów diploidalnych. Wprowadził na dwóch różnych chromosomach heterozygotyczne markery genetyczne umożliwiające fenotypowe wykrywanie utraty heterozygotyczności. Przyjął założenie, które potem zweryfikował doświadczalnie, że utrata heterozygotyczności tych markerów wynika nie z mutacji punktowych, ale z rearanżacji genomowych. W przypadku komórek drożdży rearanżacje genomowe zachodzą z częstością wielokrotnie większa niż mutacje punktowe. Aby zwiększyć częstość rearanżacji i zbadać wpływ genów, których funkcja powiązana jest ze stabilnością genomu doktorant przygotował szczepy diploidalne z delecją obu kopii analizowanych genów posiadające w/w markery heterozygotyczności. Pozwoliło to powiązać częstość rearanżacji pojedynczych i podwójnych z funkcją analizowanych genów. W oparciu o uzyskane wyniki doktorant wnioskował, że za utratę heterozygotyczności odpowiadają przede wszystkim dwa zjawiska: rekombinacja homologiczna i utrata pojedynczych chromosomów. Wykazał również negatywny wpływ rearanżacji genomowych na dostosowanie w warunkach wzrostu w pożywce płynnej oraz w warunkach głodzenia. Te wyniki pokazują, że adaptacja komórek na drodze rearanżacji genomowych to zjawisko

rzadkie a fakt obserwowania go w przypadku komórek nowotworowych i ewoluujących w nowym środowisku jednokomórkowych eukariontów wynika prawdopodobnie z silnej presji selekcyjnej faworyzującej rzadko występujące korzystne rearanżacje genomu. Podsumowując uzyskane wyniki w sposób istotny pogłębiają naszą wiedzę na temat częstości występowania rearanżacji genomowych i ich wpływu na dostosowanie komórki do środowiska.

2. Wiedza kandydata

ocena wraz z uzasadnieniem, czy rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne (sugerowane ok. 50-250 słów):

Nie mam wątpliwości, że doktorant posiadał ogólną wiedzę teoretyczną niezbędną do wykonania opisanych w rozprawie doświadczeń oraz do interpretacji uzyskanych wyników. Świadczy o tym tekst całej rozprawy a przede wszystkim teoretyczny wstęp, w którym autor demonstruje dobrą orientację, we współczesnych zagadnieniach związanych z tematyką rozprawy: szeroko pojętą mutagenезą, wpływem mutacji a w szczególności rearanżacji genomowych na dostosowanie zarówno organizmów jednokomórkowych jak też komórek nowotworowych. Autor zna mechanizmy molekularne wpływające na tempo mutacji i rearanżacji genomowych oraz rozumie znaczenie tych zjawisk dla przebiegu procesu ewolucji. W dyskusji bardzo umiejętnie wykorzystuje ogólną wiedzę teoretyczną do analizy uzyskanych wyników. Na szczególną uwagę zasługuje umiejętność dyskusowania niejednoznacznych wyników badań – takich które można wyjaśnić za pomocą alternatywnych mechanizmów lub scenariuszy ewolucyjnych. Świadczy to nie tylko o posiadanej przez doktoranta wiedzy ogólnej, ale również o umiejętności wykorzystania tej wiedzy do rozwiązania konkretnych problemów interpretacyjnych.

3. Samodzielność kandydata

ocena wraz z uzasadnieniem, czy rozprawa doktorska wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez osobę ubiegającą się o nadanie stopnia doktora (sugerowane ok. 50-250 słów):

Podobnie jak w przypadku wiedzy ogólnej lektura rozprawy nie pozostawia wątpliwości, że kandydat samodzielnie przeprowadził zarówno opisane w rozprawie doświadczenia jak też samodzielnie wykorzystał wachlarz technik obliczeniowych i bioinformatycznych do interpretacji uzyskanych wyników. Warto podkreślić, że prace wykonane przy udziale innych osób są w rozprawie szczegółowo opisane wraz z wyjaśnieniem roli doktoranta w tych pracach. Opis przygotowania materiału do badań oraz opis prowadzonych doświadczeń jest bardzo szczegółowy, ale również w pewnym stopniu osobisty - w kilku miejscach autor podkreśla, że "musiał się napracować" aby przygotować potrzebne mu szczepy drożdżowe oraz przeprowadzić doświadczenia genetyczne na dużą skalę. Taki osobisty styl nie pasuje do manuskryptu publikacji naukowej, ale moim zdaniem nie razi w rozprawie doktorskiej. Dobrze podkreśla fakt samodzielnego prowadzenia badań i interpretacji ich wyników. Z tekstu rozprawy wynika również, że doktorant nie tylko samodzielnie przygotował szczepy drożdżowe oraz przeprowadził badania genetyczne analizując zarówno wzrost drożdży jak też zawartość oraz sekwencję genomowego DNA. Samodzielnie przeprowadził również analizy wyników sekwencjonowania – co wymaga umiejętności posługiwania się zaawansowanymi narzędziami bioinformatycznymi. Autor wykazał się również umiejętnością statystycznej analizy uzyskanych wyników. O samodzielności doktoranta świadczy także organizacja rozprawy doktorskiej. Nie brakuje w niej powtórzeń, których można było uniknąć, gdyby praca była dogłębnie edytowana przez promotora. Z drugiej strony wspomniane powtórzenia opisują najważniejsze i najtrudniejsze do interpretacji wyniki uzyskane przez doktoranta co, moim zdaniem, świadczy o tym, że samodzielnie zmagał się z tekstem.

4. Oryginalność rozprawy

ocena wraz z uzasadnieniem, czy rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej lub społecznej (sugerowane ok. 100-250 słów):

Nie mam wątpliwości, że oceniana rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Mamy doczynienia z pracą badawczą której celem jest weryfikacja hipotezy, że utrata heterozygotyczności spontaniczna lub indukowana delecją genów odpowiedzialnych za utrzymywanie genomu to zjawisko, za które odpowiadają rearanżacje genomu mające charakter globalny – to znaczy, że wielokrotne utraty heterozygotyczności są częstsze niż na to wskazuje częstość pojedynczego zjawiska. Jednocześnie analiza utraty heterozygotyczności w warunkach delecji pojedynczych genów, których funkcja powiązana jest ze stabilnością genomu pokazuje, że nie ma prostej korelacji pomiędzy funkcją usuniętego genu a częstością i mechanizmem utraty heterozygotyczności – chociaż autor twierdzi, że w przypadku badanego systemu główne mechanizmy to homologiczna rekombinacja i utrata pojedynczych chromosomów. Cenne jest również jednoznaczne pokazanie, że rearanżacje genomu prowadzą do spadku dostosowania mierzonego tempem wzrostu oraz czasem przeżycia w warunkach głodzenia, oraz, że efekty te są kompensowane poprzez przywracanie równowagi genomu. Prowadzone badania pokazały również, że na poziome populacji drożdży ewolucja zachodzi bardzo szybko i niższe dostosowanie populacji jest kompensowane przez dobór naturalny w ciągu krótkiego czasu. Tak szybko, że autor nie był w stanie za pomocą analizy sekwencji zweryfikować mechanizmu molekularnego odpowiedzialnego za zmiany zawartości DNA w komórkach w których stwierdził podwójną utratę heterozygotyczności. Podsumowując zarówno postawione w rozprawie pytania, zaprojektowane w celu ich weryfikacji doświadczenia oraz otrzymane wyniki uważam, za oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

5. Pytania i/lub uwagi krytyczne, na które Recenzent oczekuje odpowiedzi kandydata w czasie obrony:

(1) Czy na podstawie uzyskanych wyników można ilościowo określić w jakim stopniu pojedyncza utrata heterozygotyczności była wynikiem lokalnych zmian sekwencji DNA np. homologiczna rekombinacja/konwersja genu a w jakim stopniu był to wynik zaburzenia struktury lub utraty chromosomu?

Czy na to pytanie można odpowiedzieć doświadczalnie- na przykład stosując dwa markery heterozygotyczności zlokalizowane blisko siebie na jednym chromosomie?

(2) Jak interpretować fakt, że wyniki doświadczeń przedstawionych w rozprawie jednoznacznie pokazują spadek dostosowania w wyniku rearanżacji genomu podczas gdy rearanżacje genomu występują powszechnie w komórkach nowotworowych oraz u jednokomórkowych eukariontów ewoluujących w nowym środowisku?

6. Inne spostrzeżenia dotyczące treści lub formy rozprawy (opcjonalnie):

Ocenianą rozprawę przeczytałem z wielkim zainteresowaniem nie tylko ze względu na bardzo interesującą hipotezę badawczą oraz otrzymane wyniki, ale również dlatego, że podoba mi się sposób w jaki rozprawa została napisana. Z drugiej strony pierwsze czytanie nie było łatwe, ponieważ układ treści jest nieco chaotyczny. Na początku zabrakło wyjaśnienia jak utarta heterozygotyczności w pojedynczych loci powiązana jest z rearanżacją genomu na większą skalę. Informację o większym tempie rearanżacji genomu w porównaniu z mutacjami punktowymi znalazłem dopiero w środku tekstu. Początek wstępu poświęcony komórkom nowotworowym w pracy opisującej doświadczenia na drożdżach jest trochę nie na miejscu – ale z drugiej strony pokazuje szerszy kontekst weryfikowanej hipotezy. Opis celu pracy jest

niezwykle rozbudowany i właściwie jest streszczeniem/podsumowaniem umieszczonym pomiędzy Materiałami i Metodami a Wynikami trochę to dziwne – ale czyta się dobrze i rozdział ten jest pomocny w zrozumieniu wyników. Najslabszym punktem recenzowanej rozprawy jest niezbyt dobre powiązanie tekstu opisującego wyniki z prezentacją wyników w postaci tabel i wykresów. Dodanie w tekście bezpośrednich odniesień do konkretnego wyniku w tabeli lub na wykresie pomogłoby czytelnikowi w zrozumieniu wyводу autora. Również podpisy pod rysunkami/tabelami mogłyby zawierać więcej informacji. Na przykład Ryc. 4 pojęcia takie jak frakcja (wew. klasy) oraz percentyle mogłyby być wyjaśnione w legendzie. W tekście zaś mógłby znaleźć się opis tego w jaki sposób należy odczytywać zależności przedstawione na wykresie posługując się przykładowymi wartościami z tego wykresu. Ryc. 8 Szczep kontrolny nie jest opisany w legendzie. Ryc. 9 i 10 brak podpisu osi pionowej prezentowanych wykresów.

7. Ocena końcowa:

Ja, niżej podpisany stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska **Adriana Piróga** spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie **Adriana Piróga** do dalszych etapów postępowania ws. nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

TAK

Ja, niżej podpisany wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

TAK

Uzasadnienie wniosku (w przypadku zaznaczenia odpowiedzi TAK)

Otrzymane wyniki oraz sposób ich interpretacji zasługuje na wyróżnienie pod warunkiem, że praca zostanie opublikowana w prestiżowym czasopiśmie.

22 07 2024

data sporządzenia recenzji

KIEROWNIK ZAKŁADU
Biogenetyki Ewolucyjnej

prof. dr hab. Jarosław Marszałek

podpis recenzenta

INFORMACJE:

1. Przygotowanie recenzji wg. niniejszego formularza jest opcjonalne i do decyzji recenzenta pozostaje wybór jej ostatecznej formy.
2. Niezależnie od formy sporządzenia recenzji, recenzent proszony jest o jasne wskazanie oceny spełnienia lub niespełnienia przez kandydatkę/kandydata wymogów określonych w art. 187 Ustawy z

dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669) z późniejszymi zmianami (obowiązujący od 7.03.2024-30.09.2024 tekst ujednolicony - Dz. U. 2023 poz. 742).

3. Wniosek o wyróżnienie rozprawy (jeżeli zgłaszany) powinien być jasno sformułowany i uzasadniony.

4. Elektroniczną wersję recenzji należy przesłać na adres: nauki.biologiczne@uj.edu.pl

5. Równocześnie recenzent proszony jest o przesłanie podpisanego oryginału recenzji na adres:

Rada Dyscypliny Nauki biologiczne
Dziekanat Wydziału Biologii
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków

(*) niepotrzebne – skreślić.