



WYDZIAŁ
BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA



Uniwersytet
ŁÓDZKI

Prof. dr hab. Janusz Maszewski
Katedra Cytofizjologii
Instytut Fizjologii, Cytologii i Cytogenetyki
Uniwersytetu Łódzkiego
Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
Tel.: 48-42-6354512, E-mail: jamasz@biol.uni.lodz.pl

26 czerwca 2014 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr Mateusza Mołonia

„Rola tempa wzrostu objętości komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w determinowaniu ich potencjału replikacyjnego i długości życia”

Jeśli miarą trudności na jakie napotyka biolog usiłujący rozwikłać jakiś problem jest liczba istniejących teorii i hipotez, wówczas proces starzenia się organizmów zaliczyć trzeba z pewnością do zagadnień o niezmiernie wysokim stopniu skomplikowania. W ogromnej rozciągłości badań na polu biogerontologii i mnogości rodzących się z nich koncepcji ukryty jest przede wszystkim emocjonalny stosunek człowieka do własnego przemijania, poszukiwanie determinantów długowieczności i odwieczna tęsknota za nieustającą młodością. Tak więc, będąc przedmiotem naszego własnego doświadczenia i osnową otaczających nas zjawisk, symptomy i mechanizmy starzenia się z natury rzeczy przyciągały ludzką uwagę bardziej niż inne procesy. Mimo tej uzasadnionej dociekliwości, wiedza oparta na obserwacjach i analizie faktów eksperymentalnych jest – z jednej strony niezupełna, a przez to otoczona horyzontem wciąż otwartych problemów, z drugiej natomiast pełna braków, niejasności i niedoskonałości teorii i wspierających je dowodów.

Chociaż natura mechanizmów różnicujących osobniki pod względem czasu trwania ich indywidualnych bytów ma charakter deterministyczny, wielość elementów cząstkowych, jakie sterują procesami starzenia się nie pozwala na łatwe i jednoznaczne przewidywanie ich znaczenia i konsekwencji. Nic zatem dziwnego, że dla biologa, który podejmuje próbę rozwikłania choćby części tajemnicy długowieczności, szczególnie istotne staje się precyzyjne sformułowania celów poznawczych i właściwych środków do ich realizacji:

równie ważny jest dobór modelu, jak i metod pracy eksperymentalnej. W tym kontekście rozprawa mgr Mateusza Mołonia dobrze spełnia każde z tych wymagań. Obiektem Jego pracy badawczej są drożdże piekarnicze (*Saccharomyces cerevisiae*), eukariotyczne organizmy jednokomórkowe o sekwencjach genomowego DNA znanych już od 1996 r., coraz lepiej i pełniej rozumianych pod względem funkcji białkowych produktów ich ekspresji.

Proces starzenia się i śmierci jednokomórkowych organizmów dzielących się symetrycznie jest kwestią kontrowersyjną, ponieważ cytokineza następująca po akcie podziału zreplikowanego jądra jest tym momentem, w którym z organizmu macierzystego powstają dwa organizmy potomne, będące w jednakowym stopniu twórcami pierwszego. Chociaż pierwotna komórka przestaje istnieć, w tej samej chwili przenosi życie do dwóch komórek potomnych, ustanawiając międzygeneracyjną ciągłość. Jednokomórkowe drożdże piekarnicze dzielące się asymetrycznie poprzez pączkowanie zdolne są do wytworzenia ograniczonej liczby komórek potomnych. Formując mniejszy od siebie pączek komórka „matka” pozostawia na swojej powierzchni swoisty akt urodzenia – bliźnię podziałową. Ich liczba, równa liczbie „zrodzonych” komórek „córek” tradycyjnie uznawana jest za wskaźnik długości życia lub miarę dynamiki procesu replikacyjnego starzenia się. Słusznie więc, bo zgodnie z istotą rzeczy, w rozprawie doktorskiej mgr Mateusza Mołonia synonimem płodności jest termin „potencjał reprodukcyjny”, a długość życia mierzona jest także czasem, w którym różna może być liczba potomnych komórek „córek” wytworzonych w cyklu życiowym komórki macierzystej. Czas życia jest więc czasem starzenia się, a zarazem sumą dwóch okresów: fazy reprodukcyjnej i postreprodukcyjnej.

Długość żadnej z tych faz nie jest zaprogramowana genetycznie, nie ma bowiem genów długowieczności; niewątpliwie jednak, jako wypadkowa wielu procesów, a więc efekt wektorowy, czas istnienia komórki-organizmu pozostaje w znacznym stopniu pod kontrolą sekwencji genomowego DNA. Niektóre z tych sekwencji mają charakter uniwersalnych regulatorów starzenia się, a ich mutacje w podobny sposób wpływają na długość życia różnych gatunków. Inne warunkują funkcje tzw. „mechanizmów prywatnych”, ujawniając swoje działanie w zakresie ograniczonym taksonomicznie; jeszcze inne stanowią specyficzne „tło genetyczne”, które w mniejszym lub większym stopniu determinuje fenotypowy efekt mutacji genów o wyraźnie zdefiniowanym wpływie na długość życia. Na tym właśnie poziomie krystalizują się podstawowe cele badawcze Doktoranta. Zróznicowane tło genetyczne zapewnia Autorowi wybór 3 „długowiecznych” (zgodnie z tradycyjną terminologią) szczepów drożdży, o odmiennych cechach morfologicznych (wielkościach komórek) i niejednakowych potencjałach reprodukcyjnych (średnich i maksymalnych). Dwa z

tych szczepów, BY4741 i BMA64-1A oraz ich mutanty, są standardowymi obiektami badań w wielu laboratoriach świata; trzeci, o wyjątkowo dużym potencjale reprodukcyjnym – SP-4 – wykorzystywany jest przede wszystkim w Katedrze Biochemii i Biologii Komórki Uniwersytetu Rzeszowskiego.

Eksperymentalna praca mgra Mateusza Mołonia przynieść miała odpowiedź na pytanie: jakie efekty fenotypowe, ujawniające się w kontekście genetycznego tła wybranych szczepów *S. cerevisiae*, wywołują delecje trzech genów – *FOB1*, *SCH9* i *RPL20B*. Wcześniejsze obserwacje wykazały, że ich brak lub inaktywacja przyczynia się do wzrostu potencjału reprodukcyjnego. Uzupełnieniem stworzonego tak modelu doświadczalnego było włączenie czwartego mutantu delecyjnego, *sfp1Δ*, charakteryzującego się przeciwnymi efektami fenotypowymi, a więc redukcją średniej i maksymalnej liczby generacji wytwarzanych komórek „córek”. Pierwszym z zadeklarowanych celów badań mgra Mateusza Mołonia było określenie potencjalnych związków między osiąganymi rozmiarami komórek wybranych szczepów drożdży a długością ich reprodukcyjnej fazy życia; drugim – porównanie wpływu mutacji na potencjał reprodukcyjny i rzeczywistą długość życia komórek.

Wstęp do rozprawy doktorskiej opisuje drożdże jako organizm modelowy, przedstawia teorie wyjaśniające przyczyny zróżnicowanej długości życia komórek i organizmów, a jego trzecia – moim zdaniem – najciekawsza część umiejscawia obiekt własnych badań Autora w perspektywie współczesnych problemów nauki o mechanizmach i przebiegu procesów starzenia się. Przegląd aktualnego stanu tej wiedzy, osadzony na tle odkryć trwale zapisanych w historii biogerontologii uwzględnia m.in. wpływ czynników regulacji metabolicznej, uwarunkowania genetyczne, znaczenie aktywności telomerazy i reaktywnych form tlenu, odpowiedzialnych za uszkodzenia struktur komórkowych. Na koniec, koncentrując się na dwóch modelach procesu starzenia (replikacyjnym i chronologicznym) oraz genetycznych aspektach „długowieczności” drożdży, Autor wprowadza czytelnika w kontekst własnego układu doświadczalnego.

Osiągnięcie pozornie prostych celów, jakie postawił sobie mgr Mateusz Mołoń wymagało zarówno właściwego przygotowania materiału badawczego, wyboru odpowiednich genów, opanowania sposobu ich eliminacji i umiejętnego zastosowania bogatego arsenału nowoczesnych technik eksperymentalnych. W ich zestawie, oprócz metod biologii molekularnej (PCR, transformacji genetycznej, sekwencjonowania, analizy profili polisomów), jest więc także mikromanipulacja, kolorymetria izotermalna, badania radioizotopowe, mikroskopia fluorescencyjna i elektronowa mikroskopia skaningowa). Dobór

tych technik, nade wszystko jednak sposób ich wykorzystania w trakcie realizacji poszczególnych zadań eksperymentalnych należy ocenić – moim zdaniem – bardzo wysoko.

O rzeczywistej, merytorycznej wartości rozprawy doktorskiej mgr Mateusza Mołonia i mojej wysoce pozytywnej ocenie Jego pracy decydują przede wszystkim uzyskane wyniki. Ich opis jest konsekwentnym, systematycznym i dobrze udokumentowanym rejestrem wpływu delecji genów *FOBI*, *SCH9*, *RPL20B* i *SFP1* na kinetykę wzrostu badanych mutantów, ich potencjał reprodukcyjny, zmiany objętości komórki podczas kolejnych generacji oraz ich reprodukcyjną i postreprodukcyjną długość życia. Rezultaty badań dotyczących potencjału reprodukcyjnego wskazują, że dla większości mutantów fenotyp wynikający z braku tych genów nie jest jednakowy, wyraźnie zależy bowiem od szczepu referencyjnego, a więc tła genetycznego. Genem, którego *knock-out* – bez względu na tło genetyczne – prowadzi do podobnych efektów jest specyficzny dla *S. cerevisiae* *FOBI*; jego białkowy produkt zlokalizowany w jąderku zaangażowany jest w blokowanie widełek replikacyjnych i aktywność „gorącego miejsca” rekombinacji. Istotny wpływ tła genetycznego charakteryzuje natomiast fenotypowe efekty delecji genu *SCH9*, kodującego kinazę szlaku kontrolnego, który nadzoruje gospodarkę składnikami odżywczymi i monitoruje metaboliczny stan komórki. Mutacje genu *RPL20B* zaburzają proces formowania się dużej podjednostki rybosomowej, obniżając tym samym profil polisomów i translacji, natomiast delecja *SFP1*, którego produkt jest białkiem o motywie palca cynkowego, redukuje tempo wzrostu komórek drożdży i modyfikuje przebieg cyklu komórkowego w krytycznym okresie przejścia G2/M (wywołując m.in. przedwczesną inicjację mitozy).

Istotną rolę w regulacji potencjału reprodukcyjnego odgrywa tempo wzrostu komórki „matki” (zarówno w odniesieniu do jej fazy proliferacyjnej, jak i pojedynczej generacji), chociaż jej objętość maksymalna u mutantów o podwyższonej zdolności do podziałów jest najczęściej bliska objętości komórki ze szczepu wyjściowego. Badania mgr Mateusza Mołonia ujawniły, że hipertrofia wywołana przez niektóre z indukowanych mutacji wiąże się ze wzrostem potencjału reprodukcyjnego. Długość okresu aktywności proliferacyjnej, podczas którego tworzone są kolejne generacje komórek, wyznacza zarówno liczba cykli podziałowych (potencjał reprodukcyjny), jak i długość pojedynczego cyklu, przy czym oba te czynniki – łącznie lub niezależnie od siebie – wywoływać mogą taki sam efekt. Przykładem może być tu jednakowo długa reprodukcyjna faza życia komórek szczepu BMA64-1A z delecjami genów *FOBI* i *SFP1*.

Jednym z najważniejszych osiągnięć rozprawy doktorskiej mgra Mateusza Mołonia są te spośród licznych wyników Jego analiz, które wydają się skłaniać do istotnej rewizji

wniosków jakie płyną z dotychczasowych badań nad starzeniem się *S. cerevisiae*. Przyjęcie nowej i – jak się wydaje – w pełni racjonalnej miary, jaką przy określaniu długości życia jest wpływ czasu (a nie płodność, czyli potencjał reprodukcyjny) wskazuje, że szczepy drożdży opisywane dotąd jako „długowieczne” żyją w istocie krócej lub tylko równie długo jak szczepy referencyjne. Znaczny wydatek energetyczny związany z tworzeniem nowych generacji komórek „córek” przynieść może swoiste obniżenie standardu życia komórki „matki”. W tym kontekście, zaskakująca zmiana „statusu” dotyczy mutantu *sfp1Δ*, który – w oparciu o liczbę generacji – uznawany jest jako krótko żyjący; analiza łącznej długości obu faz jego życia wyraźnie wykazuje jednak na „długowieczność”. W dążeniu do ujawnienia czynników determinujących ten efekt mgr Mateusz Mołoń angażuje techniki rejestrujące parametry bioenergetyczne drożdży *sfp1Δ*: ocenia profile polisomów, analizuje dynamikę inkorporacji [³⁵S]-metioniny *in vivo*, wykonuje pomiary przy użyciu mikrokalorymetrii izotermicznej, oznacza zawartość ATP, a stosując fluorescencyjny znacznik FUN-1 ocenia aktywności metaboliczne komórek. Uzyskane wyniki wydają się wskazywać, że kluczowym czynnikiem „długowieczności” jest obniżone tempo metabolizmu komórkowego.

Mgr Mateusz Mołoń komentuje rezultaty swojej pracy badawczej w zwięźle napisanej Dyskusji i kilku najistotniejszych wnioskach. Autor nie formułuje przy tym stwierdzeń kategorycznych lub pochopnych; swoje własne uwagi przedstawia zawsze z należytą ostrożnością, a ilekroć wprowadza jakąś sugestię, logicznie i zarazem krytycznie argumentuje własny punkt widzenia, w kontekście dobrze dobranej literatury naukowej. Daty cytowanych artykułów sięgają jednak – na ogół – lat dość odległych (co w wielu przypadkach jest w pełni uzasadnione ze względu na znaczenie pierwszych, historycznych publikacji). Nie czynię więc z tego faktu zarzutu, jednak kierowany wyłącznie ciekawością pytam o przyczynę.

Niewątpliwym osiągnięciem Doktoranta jest potwierdzenie (poprzez układ doświadczalny odmienny od dotychczasowych wykorzystywanych), że czynnikiem ograniczającym potencjał reprodukcyjny komórek drożdży jest ich krytyczna wielkość, blokująca możliwość kontynuacji podziałów mitotycznych. Zwiększenie maksymalnej objętości komórki, będące fenotypowym efektem niektórych mutacji, może jednak stwarzać warunki do wzrostu aktywności reprodukcyjnej, wyrażającej się zwiększoną liczbą generacji komórek potomnych. Sukcesem Autora jest także – moim zdaniem – jednoznaczne wykazanie roli tła genetycznego w modyfikowaniu fenotypowych efektów delecji genów *FOB1*, *SCH9*, *RPL20B* i *SFPI*, których biologiczna rola w mniejszym lub większym stopniu determinuje ogólny poziom metabolizmu komórkowego.

Podczas lektury całej pracy doszukałem się niewielu błędów redakcyjnych, na tyle mało istotnych i w niczym nie umniejszających mojego uznania dla wkładu i jakości pracy mgr Mateusza Mołonia, że za w pełni uzasadnione uznałem pominięcie większości z nich, a swoje spostrzeżenia przekazać bezpośrednio Autorowi. Przedstawię dwie uwagi. Pierwsza dotyczy większości ilustracji zamieszczonych we wstępnej części rozprawy (Ryc. 3, 4, 5, 7, 8, 9 i 10). Jestem przekonany, że wartość prezentowanych tam schematów znacznie zyskałaby poprzez obszerniejsze ich skomentowanie lub wyjaśnienie w podpisach, przez co stałaby się one bardziej komunikatywnym źródłem informacji dla osób przygotowujących prace licencjackie i magisterskie. Druga uwaga dotyczy powtórzeń krótszych lub dłuższych fragmentów tekstu (np. na str. 40 we Wstępie i str. 124 w Dyskusji: „Pierwsze doniesienia...”) oraz pewnych skrótów i sformułowań (takich jak: „Cele podjętego problemu badawczego” str. 47, „Dodatkowo użyto genu SFP1, uznawanego za >krótko żyjący<” na str. 61, lub często powtarzający się, długo dla mnie tajemniczy termin „czas podwojenia”. Zmieniłbym także fragment zdania o akumulacji „kółek rDNA” mówiący, że „...dochodzi do akumulacje tego balastu...”.

W ramach dyskusji nad tezami rozprawy doktorskiej mgra Mateusza Mołonia prosiłbym także o odpowiedź na 2 pytania. Pierwsze dotyczy ostatniego zdania na stronie 128: jakie mechanizmy zabezpieczają komórkę przed śmiercią w wyniku pęknięcia? Drugim pytaniem nawiązuję do krótkiej informacji na stronie 35: W jakim stopniu „tło genetyczne” uwarunkowane jest – jeśli jest - czynnikami epigenetycznymi?

Na zakończenie podkreślić chcę ponownie, że zaletą recenzowanej przeze mnie pracy jest jej merytoryczna spójność, wynikająca z doskonale zaplanowanych i konsekwentnie realizowanych zadań badawczych. Niewątpliwym osiągnięciem Doktoranta są nie tylko, wartościowe wyniki dotyczące starzenia się komórek drożdży, ale także nabyte i w pełni już udokumentowane możliwości umiejętnego wykorzystania nowoczesnych technik biologii molekularnej i genetyki w zmaganiach z równie ciekawym, co trudnym problemem. Z głębokim przekonaniem składam więc Wysokiej Radzie Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Mateusza Mołonia i dopuszczenie jej Autora do publicznej obrony. Pragnę także wyrazić przekonanie, że ta rzetelna i wnikliwa rozprawa powinna być wyróżniona stosowną nagrodą. Niniejszym o to wnioskuję.



prof. dr hab. Janusz Maszewski