



Warszawa, 21 maja 2019

Dr hab. Marek Skoneczny

Zakład Genetyki IBB PAN

Recenzja

Rozprawy doktorskiej pana mgr Romana Maślanki pt.:

Wpływ glukozy i jej metabolizmu na stan fizjologiczny, potencjał reprodukcyjny i długość życia komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana na Wydziale Biologiczno-Rolniczym Uniwersytetu Rzeszowskiego, pod kierunkiem dr hab. Renaty Zadrąg-Tęcza, prof. UR, jako promotora oraz dr Magdaleny Kwolek-Mirek, jako promotora pomocniczego. Rozprawę przygotowano zgodnie z wymogami ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U., poz. 595) z późniejszymi zmianami (Dz.U. z roku 2016, poz. 882).

Praca doktorska przedstawiona do recenzji ma postać zbioru czterech artykułów opatrzonych szczegółowym omówieniem. Trzy z tych artykułów opublikowane zostały w czasopismach anglojęzycznych znajdujących się na liście Web of Science. Ich łączny współczynnik oddziaływania wynosi 8,233. We wszystkich czterech autor dysertacji jest pierwszym autorem, a w trzech z nich również autorem korespondującym. Te dane ujawniają dominującą rolę doktoranta w tworzeniu tych prac, zarówno na etapie eksperymentalnym jak i przygotowywania manuskryptu. Potwierdza to dołączone do pracy oświadczenie stwierdzające, że udział autora w ich powstawaniu wynosił od 60 do 80%.

Jak na tę formę rozprawy doktorskiej podsumowanie dokonań opisanych w publikacjach stanowiących jej podstawę jest bardzo obszerne, bo mieści się na 44 stronach, nie wliczając listy piśmiennictwa i składa się z Wprowadzenia, opisu Metod, Wyników, ich Dyskusji i Wniosków. Część opisową pracy zamyka krótki podrozdział „Perspektywy” przedstawiający kierunki dalszych badań otworzone dzięki wynikom uzyskanym przez doktoranta oraz podrozdział opisujący pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze doktoranta. Dowiadujemy się z niego, że mgr Roman Maślanka jest również współautorem siedmiu publikacji niewchodzących w skład rozprawy doktorskiej, zarówno eksperymentalnych jak i o charakterze przeglądowym, w tym trzech w języku angielskim. Dowiadujemy się ponadto, że aktywnie uczestniczył w licznych krajowych i międzynarodowych konferencjach, jako prelegent lub autor plakatu. Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazało się jego 11 opublikowanych do tej pory artykułów (w tym 6 w języku angielskim) wynosi 12,192. Taki dorobek naukowy u osoby nieposiadającej jeszcze stopnia doktora uważam za wybitny.

Pozostałą część pracy stanowią reprinty publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej i oświadczenie o udziale doktoranta w ich powstawaniu.

Podsumowanie swoich dokonań doktorant rozpoczął od zapoznania czytelnika w rozdziale „**Wprowadzenie**” z różnymi aspektami dostępności składników pokarmowych w środowisku organizmów żywych, w szczególności uniwersalnego substratu energetycznego i budulcowego komórek – glukozy. Omówił jej udział w procesach katabolicznych i anabolicznych komórek oraz jej rolę, jako cząsteczki sygnalizującej dostępność składników pokarmowych. Zwrócił uwagę, że choć wewnątrzkomórkowe drogi metabolizmu glukozy są dobrze scharakteryzowane to nadal możliwe jest poszerzanie naszej wiedzy w tym temacie. Podkreślił, że w przeciwieństwie do ograniczenia dostępności pokarmu – restrykcji kalorycznej, skutki nadmiaru pokarmu – wysokiego stężenia glukozy w środowisku komórek, nie są dogłębnie zbadane, zwłaszcza dla powszechnego jednokomórkowego modelu badawczego, jakim są drożdże *Saccharomyces cerevisiae*. Tymczasem: „... stan utrzymującego się wysokiego stężenia glukozy może doprowadzić do zaburzenia funkcji komórek m.in. wskutek: i) zakłócenia regulacji wzrostu i podziałów komórki, ii) nasilenia zjawiska glikacji białek o długim okresie półtrwania, iii) indukcji stresu oksydacyjnego w następstwie zwiększonej generacji RFT i/lub obniżenia komórkowej puli NADPH czy też iv) nasilonej aktywacji szlaku polioliowego.” Ten deficyt wiedzy oraz interesujące wcześniejsze obserwacje zespołu, do którego dołączył doktorant były inspiracją dla podjętych przez niego badań.

W rozdziale **Materiały i Metody** doktorant dokonał przeglądu metod zastosowanych w swojej pracy, które pozwoliły mu na wieloaspektową analizę wpływu obecności glukozy w pożywce hodowlanej na komórki drożdży. Wśród nich na uwagę zasługuje nowatorskie zastosowanie fluorescencyjnego analogu glukozy, 6-NBDG, do określenia tempa pobierania glukozy i w tym kontekście dokładne scharakteryzowanie zjawiska autofluorescencji komórek drożdży, która może mieć wpływ na wiarygodność wyników uzyskiwanych z pomocą barwników fluorescencyjnych.

Zastosowane metody pozwoliły na określenie parametrów morfologicznych i biochemicznych komórek drożdży hodowanych na podłożach zawierających różne stężenia glukozy, takich jak: rozmiary i zdolności biosyntetyczne komórek, struktura sieci mitochondrialnej i potencjał błonowy mitochondriów, tworzenie reaktywnych form tlenu (RFT), poziomy ATP, pule NADPH i NADP⁺ oraz aktywności enzymów szlaku pentozofosforanowego. Pozwoliły również na analizę potencjału reprodukcyjnego oraz całkowitej długości życia komórek drożdży. Do analizy statystycznej wyników zastosowano odpowiednie oprogramowanie.

W opisanych w rozdziale **Wyniki** eksperymentach doktorant dokonał gruntownej analizy wpływu różnych stężeń glukozy obecnej w pożywce na różne aspekty życia komórek drożdży *S. cerevisiae*. Zaczął od ustalenia stężeń glukozy w hodowli na poziomie 0,5%, 2% i 4%, które stanowiły odpowiednio warunki restrykcji kalorycznej, optimum pokarmowego i jego nadmiaru. Swoje eksperymenty prowadził wykorzystując szczep typu dzikiego oraz mutanty delecyjne pozbawione genów *GPA2*, *GPR1* kodujących podjednostki kompleksów zlokalizowanych w błonie plazmatycznej, odpowiedzialnych za ocenę dostępności składników pokarmowych w otoczeniu komórki oraz *HXK2* kodującego enzym fosforylujący glukozę. W niektórych eksperymentach zastosował szczepy pozbawione genów kodujących dysmutazy ponadtlenkowe, *SOD1* i *SOD2*.

Stosując wymienione wyżej techniki doktorant przetestował wpływ zewnętrznego stężenia glukozy na jej wewnątrzkomórkowy poziom w badanych szczepach, zmierzył tempo wzrostu, żywotność i wielkość komórek hodowanych w obecności różnych stężeń glukozy oraz ich zdolności biosyntetyczne. Zmierzył poziom reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach badanych szczepów w obecności różnych stężeń glukozy, a także wskazał na istnienie silnych pozamitochondrialnych źródeł RFT. Zmierzył poziomy ATP i NADP(H) w tych warunkach. Określił także zdolność reprodukcyjną i długość życia komórek badanych szczepów w warunkach różnego stężenia glukozy.

W olbrzymim skrócie jego wyniki pokazały, że pobieranie, a zatem wewnątrzkomórkowe stężenie glukozy było niższe w komórkach szczepów delecyjnych niż w szczepie typu dzikiego, a wiele innych różnic między szczepami zaobserwowanych przez doktoranta było tego konsekwencją. Prowadzi to do niezaskakującego wniosku, że poziomy wszystkich mierzonych parametrów były zdeterminowane wewnątrzkomórkowym stężeniem glukozy, na które wpływ miały zarówno jej stężenie na zewnątrz komórki jak i zdolność komórki do jej poprawnej detekcji i asymilacji, zaburzona w komórkach szczepów delecyjnych.

Wraz ze wzrostem stężenia glukozy wzrastała średnia wielkość komórek, a także ich zdolności biosyntetyczne, ale tylko dla szczepów typu dzikiego. Ale jednocześnie w hodowli zawierającej wysokie, 4% stężenie glukozy, czyli jej nadmiar, odsetek martwych komórek wzrastał sięgając 8%. W tych samych warunkach doktorant obserwował zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu, wyższą w szczepie typu dzikiego niż w szczepach delecyjnych. Pokazał, że pochodzą one ze źródeł pozamitochondrialnych, co przeczy utartemu pogładowi o mitochondriach, jako głównym komórkowym źródle RFT. Ustalenia doktoranta zgodne są natomiast z nieczęsto spotykanym w literaturze poglądem, że w sprawnych metabolicznie mitochondriach reakcje redoks są dobrze zestrojone i produkują niewiele RFT. Są one natomiast silniej uwalniane przez defektywne mitochondria, co jest sygnałem o obniżonej żywotności komórki, decydującym o skierowaniu jej na drogę prowadzącą do programowanej śmierci. Stosując fluorescencyjne sensory reagujące specyficznie z różnymi RFT oraz szczepy pozbawione genów kodujących dysmutazy ponadtlenkowe doktorant ustalił, że główną reaktywną formą tlenu generowaną pozamitochondrialnie jest anionorodnik ponadtlenkowy.

Wraz ze wzrostem stężenia glukozy w pożywce spadał poziom ATP w komórkach, bardziej w szczepie typu dzikiego, co doktorant interpretuje, jako skutek przesunięcia równowagi metabolicznej od oddychania do fermentacji oraz zwiększenia przy wyższych stężeniach glukozy udziału szlaku pentozofosforanowego w jej metabolizmie. Co ciekawe, tendencja ta widoczna była również dla 8% i 10% glukozy. Przy tych stężeniach glukozy w pożywce poziom ATP w komórkach był jeszcze niższy.

Przy wysokich stężeniach glukozy równowaga NADP⁺/NADPH przesunięta była na korzyść utlenionego nukleotydu, bardziej w szczepie typu dzikiego. To z kolei, według doktoranta było konsekwencją zwiększonego poziomu utleniania NADPH związanego z jego wykorzystywaniem, między innymi, w procesach biosyntetycznych.

Szczególnie interesujące były ustalenia na temat wpływu różnych stężeń glukozy na zdolność reprodukcyjną i długość życia komórek drożdży. Doktorant zaobserwował spadek ich potencjału reprodukcyjnego, gdy stężenie glukozy w pożywce rosło, ale efekt ten był widoczny tylko dla

szczepu typu dzikiego. Tę różnicę, podobnie jak pozostałe różnice między tym szczepem, a szczepami delecyjnymi doktorant tłumaczy niższym tempem pobierania przez nie glukozy, a tym samym, zmniejszeniem jej wewnątrzkomórkowego poziomu. Spadek potencjału reprodukcyjnego wraz ze wzrostem stężenia glukozy był negatywnie skorelowany z wielkością komórek szczepu typu dzikiego i ich możliwościami biosyntetycznymi, co nie dziwi skoro te wartości w hodowli w obecności 4% glukozy były wysokie.

W następnym rozdziale doktorant dokonał wyczerpującej **dyskusji** uzyskanych przez siebie wyników w świetle dostępnej literatury przedmiotu. Na szczególną uwagę zasługują odniesienia wyników uzyskanych przez doktoranta do chorób cywilizacyjnych: otyłości i cukrzycy typu 2, wskazujące na przydatność poczynionych ustaleń dla prewencji i skutecznej terapii tych trapiących współczesnego człowieka schorzeń.

We **Wnioskach** doktorant zwięźle podsumował swoje osiągnięcia, szczegółowo opisane wcześniej. Zaprezentowane wyniki uzupełniają naszą wiedzę na temat wszechstronnie badanego i to od wielu lat zagadnienia metabolizmu uniwersalnego substratu energetycznego i budulcowego, jakim jest glukoza.

Pouczający jest rozdział **Perspektywy**, w którym doktorant zwrócił uwagę na kilka interesujących zagadnień stanowiących punkt wyjścia do podjęcia nowych tematów badawczych, takich jak: poza-mitochondrialne RFT; biosynteza i degradacja, a zdolności reprodukcyjne komórek; nadmiar kalorii, a jakość życia organizmów, zwłaszcza zdrowie współczesnego człowieka.

Projekt wykonywany przez doktoranta znamionowała staranność i dogłębne przemyślenie eksperymentów na etapie ich projektowania i przygotowania narzędzi badawczych, co zaowocowało interesującymi wynikami. Wszechstronna ich analiza pozwoliła na wyciągnięcie interesujących wniosków. Wszystko to znamionuje dojrzałość doktoranta jako eksperymentatora i jest dobrym prognostykiem jego sukcesów jako samodzielnego badacza.

Staranność przygotowania recenzowanej rozprawy doktorskiej jest przykładowa. Tekst rozprawy zawiera jedynie nieliczne, drobne błędy gramatyczne, przeoczone na etapie redagowania tekstu, które w najmniejszym stopniu nie utrudniały zapoznania się z nim.

Wobec braku istotnych zastrzeżeń i uchybień, które wymagałyby komentarza doktoranta w czasie publicznej obrony proponuję by w jej trakcie doktorant przedyskutował i zaproponował możliwe wyjaśnienia, choćby najbardziej spekulatywne, zaobserwowanego przez siebie ciekawego i w pierwszej chwili przeczącego intuicji zjawiska niższej zdolności reprodukcyjnej szczepu typu dzikiego hodowanego w pożywce z nadmiarem glukozy. Przecież na bogatej pożywce drożdże mnożą się bardzo szybko, więc pozornie ich zdolność reprodukcyjna jest wysoka. Czy może to mieć związek, a jeśli tak, to jaki, z podwyższeniem poziomu reaktywnych form tlenu i przesunięciem równowagi NADP⁺/NADPH w stronę utlenionej formy nukleotydu w warunkach nadmiaru glukozy oraz z tym, że w tych warunkach odsetek martwych komórek sięgał 8%?

Podsumowując, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Romana Maślanki pt.: „Wpływ glukozy i jej metabolizmu na stan fizjologiczny, potencjał reprodukcyjny i długość życia komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*”, wykonana pod kierunkiem dr hab. Renaty Zdraąg-Tęcza, prof. UR (promotora) i dr Magdaleny Kwolek-Mirek (promotora pomocniczego) na Wydziale

Biologiczno-Rolniczym Uniwersytetu Rzeszowskiego, spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę zatem do Rady Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego o dopuszczenie Pana mgr Romana Maślanki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, doceniając wartość przedstawionych w pracy wyników wnoszę do Rady Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego o wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej.

Dr hab. Marek Skoneczny

