

Prof. dr hab. Ewa Sikora
Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia
e-mail: e.sikora@nencki.edu.pl

Warszawa, 30 kwietnia 2023

Ocena osiągnięcia naukowego zatytułowanego "Czynniki determinujące proces starzenia się w układzie modelowym drożdży pączkujących *Saccharomyces cerevisiae*" oraz całokształtu dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego dr Mateusza Mołonia w związku z wnioskiem o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

1. Sylwetka naukowa oraz osiągnięcia dydaktyczne i organizacyjne habilitanta

Pan Mateusz Mołoń ukończył studia magisterskie na Wydziale Biologiczno-Rolniczym na Uniwersytecie Rzeszowskim. Tam też obronił pracę doktorską w 2014 roku, a rok przedtem ukończył studia podyplomowe z biologii molekularnej na Wydziale BBB UJ. Zarówno praca magisterska jak i doktorska wykonane były na komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* pod opieką wówczas dr. Renaty Zadrąg-Tęczy (promotor pracy magisterskiej i opiekun pomocniczy pracy doktorskiej). Promotorem tej ostatniej był prof. dr hab. Tomasz Biliński, o którym można powiedzieć, że stworzył polską szkołę badań starzenia i długowieczności drożdży *S. cerevisiae*. Jak widać, nadal badania w Rzeszowie prowadzone na modelu drożdżowym mają się bardzo dobrze. Należy podkreślić, że jest to jedyny taki ośrodek w Polsce.

W latach 2010-2020 habilitant odbył kilka miesięcznych staży w trzech różnych ośrodkach badawczych w Polsce. Niestety nie odbył żadnego dłuższego stażu podoktorskiego w zagranicznym laboratorium. Wiem z praktyki, że habilitanci często się oburzają kiedy zwraca się na to uwagę, ale moim zdaniem staż w innym ośrodku poza jednostką macierzystą, nawet jeśli oceniany przez stażystę jako nieudany, to jednak ma wiele różnorodnych korzyści. Nie ma oczywiście w tym momencie sensu, aby przekonywać habilitanta do podjęcia takiej aktywności, gdyż jest na to za późno. Po prostu szkoda. Zwłaszcza, że w ankiecie jest wymóg umieszczenia informacji o „wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej”. W tym punkcie habilitant przywołuje krótkie krajowe staże, które zaowocowały publikacjami. Opisuje też inne krajowe współpracy, które nie wymagały, jak rozumiem, prowadzenia badań poza Uniwersytetem Rzeszowskim.

Dorobek dydaktyczny, jak zwykle w przypadku pracownika uczelni, budzi mój duży respekt.

Habilitant od 2016 roku był promotorem pomocniczym jednej zakończonej pracy doktorskiej, dziewięciu prac magisterskich, dwunastu prac licencjackich i jednej pracy inżynierskiej. Obecnie jest promotorem jednej pracy licencjackiej, pięciu prac magisterskich oraz promotorem pomocniczym jednej pracy doktorskiej (obrona zaplanowana jest na koniec 2023 r.). Pan dr Mołoń może się też pochwalić inną działalnością dydaktyczną i popularyzatorską, która jest w zupełności satysfakcjonująca jak na stosunkowo krótką aktywność zawodową.

2. Dorobek naukowy dr Mateusza Mołonia nie wchodzący w skład ocenianego osiągnięcia naukowego.

Pan dr Mołoń jest w sumie współautorem ponad 20 prac opublikowanych po doktoracie, które nie wchodzą w skład osiągnięcia habilitacyjnego. Część prac dotyczy badań związanych z metabolizmem oraz chromatyną w modelu starzenia komórek drożdżowych. Można powiedzieć, że osiągnięcie habilitacyjne jest rozwinięciem tej tematyki. W innych pracach wykorzystano drożdże pączkujące jako model do analiz właściwości składników pochodzenia naturalnego, takich jak kawa, aronia, karnozyna, kurkumina, czy też miód rzepakowy wzbogacony aronią.

W ramach badań realizowanych wraz z Instytutem Nauk Medycznych Kolegium Nauk Medycznych UR pan dr Mołoń bierze udział w oznaczaniu biomarkerów stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego w surowicy pacjentów chorujących na mukowiscydozę, atopowe zapalenie skóry, przewlekłą pokrzywkę spontaniczną oraz schorzenia urologiczne. Badania te mają na celu opracowanie analizy nowych nieinwazyjnych biomarkerów, które mogłyby pomóc w ocenie stanu pacjentów, a także korelacji tych markerów z nasileniem, jak i postępem chorób oraz z odpowiedzią terapeutyczną. Jak pisze habilitant, techniki używane do pomiaru biomarkerów są proste, szybkie i niedrogie, dlatego mogą być stosowane w codziennej rutynowej praktyce laboratoryjnej do oceny i monitorowania stanu zdrowia chorych.

Tak więc, aktywność naukowa dr Mołonia nie ogranicza się wyłącznie do badań z zastosowaniem modelu drożdżowego, aczkolwiek drożdże stanowią jego główny obiekt naukowych zainteresowań.

3. Ocena merytoryczna i formalna osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

W skład osiągnięcia wchodzi siedem prac doświadczalnych. W pięciu z nich habilitant jest pierwszym i korespondującym autorem, w jednej jest równorzędnym z pierwszym drugim i ko-korespondującym, a w pracy z numerem 7, jest gdzieś „zgubiony w środku”. Formalnie jak i merytorycznie sześć prac wystarczyłoby w zupełności, gdyż w tej siódmej ewidentnie rola habilitanta, w odróżnieniu od pozostałych, nie jest wiodąca. Prace zostały opublikowane w dobrych czasopismach, z których większość ma przyzwoity IF. Są to takie czasopisma jak Biogerontology, Molecular Biology Reports, Cell Cycle czy FEMS Yeast Res. Nie da się ukryć,

że najlepsze współczynniki przebicia mają czasopisma MDPI, w których znalazły się w sumie dwie publikacje habilitanta. Na uwagę zasługuje fakt, że wszystkie prace były opublikowane w bardzo krótkim okresie, mianowicie od 2017 do 2022 roku, a więc w ciągu pięciu lat.

Trochę żałuję, że habilitant nie pokusił się o napisanie pracy poglądowej, zwłaszcza, że jak pisze w Autoreferacie, drożdże jako model starzenia są ciągle kontrowersyjne, gdyż nie wiadomo do końca na ile odzwierciedlają starzenie komórek i organizmów wielokomórkowych. Miałby on szanse bronić swojego poglądu.

Autoreferat jest bardzo długi, ale zabrałam się do czytania go z wielkim zapałem, gdyż prawdę mówiąc od dość dawna nie śledziłam prac wykonanych na tym modelu doświadczalnym, a osiągnięcie zatytułowano „Czynniki determinujące proces starzenia się w układzie modelowym drożdży pączkujących *Saccharomyces cerevisiae*”.

Z wprowadzenia do zagadnienia niestety niewiele się dowiedziałam o starzeniu drożdży. Jest to w zasadzie krótki wyciąg z cytowanej przez habilitanta pracy: Kaeberlein, M. Lessons on longevity from budding yeast. *Nature* 2010, 464, 513-519, doi:10.1038/nature08981. Plusem jest to, że za cytowanym autorem wyjaśnione są pojęcia replikacyjnego i chronologicznego starzenia się drożdży. Jak się weźmie pod uwagę, że po zakończeniu replikacji (zatrzymanie cyklu komórkowego), komórka matka jeszcze żyje jakiś czas, to można by uznać, że istnieje tu pewne podobieństwo ze starzeniem replikacyjnym komórek ssących w hodowli (replicative senescence). Wydaje mi się dość istotne, aby w przypadku drożdży nie mylić pojęcia starzenia z długością życia. Generalnie starzenie i długość życia są ze sobą powiązane, ale jednak są to odrębne pojęcia. Natomiast model starzenia drożdży ma tę zaletę, że stosunkowo łatwo uzyskać mutanty, które różnią się między sobą długością życia oraz badanymi funkcjami komórek drożdżowych. Badania starzenia drożdży przysłużyły się do odkrycia sirtuin i TOR, a ssacza sirtuina SIRT1 jest homologiem drożdżowej Sir2. Ponieważ SIRT1 jest, między innymi, zaangażowana w naprawę uszkodzeń DNA, które są kluczowe dla starzenia komórkowego, można przypuszczać że nadekspresja Sir2 w drożdżach przyczynia się do zmniejszenia akumulacji cząstek kolistego DNA, które są wynikiem niestabilności genomowej drożdży charakterystycznej dla ich starzenia. Myślę, że drożdżowy model starzenia się może nam jeszcze niejedno powiedzieć o starzeniu się komórek ssaków. Tak więc, badania habilitanta są jak najbardziej uzasadnione i zapoznanie się z jego pracami składającymi się na osiągnięcie, utwierdziło mnie w tym przekonaniu.

Głównym nurtem sześciu z siedmiu prac zaliczanych do osiągnięcia habilitanta jest badanie, zgodnie z tytułem, mechanizmów związanych ze starzeniem i długością życia pączkujących drożdży. Prace te poruszają wiele aspektów, które mogą mieć związek ze starzeniem się *S. cerevisiae*, bądź też wpływać na ten proces. Jest to: tło genetyczne szczepów drożdżowych (praca H1), mechanizmy komórkowe mające wpływ na potencjał reprodukcyjny oraz długość życia komórek córek pochodzących od starych matek (praca H3), struktura ściany komórkowej (praca H2), wybrane elementy maszynerii translacyjnej, w tym budowa rybosomów (prace H4,

H5, H6). Podejrzewam, że w ostatniej pracy (H7) habilitant służył ekspertyzą w dziedzinie hodowli komórek drożdżowych ulegających starzeniu, więc jak pisałam wcześniej, praca ta nie koniecznie powinna występować jako element osiągnięcia habilitanta. Wszystkie prace są dość obszerne, zawierają wiele wyników otrzymanych z zastosowaniem nowoczesnych metod pomiarów, analizy i wizualizacji. Do podstawowych metod niezbędnych prowadzeniu tego typu badań należy hodowla komórek drożdżowych ze żmudną mikromanipulacją oraz badanie kinetyki wzrostu komórek i kolonii z uwzględnieniem okresu pączkowania i post-reprodukcyjnego. Ponadto, wykorzystano metodę generacji szczepów pozbawionych mitochondrialnego DNA (rho0) jak również metody analizy genetycznej, takie jak: Array-based comparative genomic hybridisation (a-CGH), FISH, otrzymywanie plazmidów, analizy translacji, badanie profili polisomów, metody immunocytochemiczne, elektroforezę, mikroskopię świetlną, elektronową skaningową, sił atomowych, spektroskopię FTIR (fourierowska w podczerwieni), sekwencjonowanie RNA, analizę uszkodzeń DNA (kometka), cytometryczną analizę cyklu komórkowego, i oczywiście analizy statystyczne. Warsztat badawczy jest rzeczywiście imponujący. Mam wrażenie, że habilitant wykorzystał całe bogactwo warsztatowe Uniwersytetu Rzeszowskiego. Prace są bardzo dobrze udokumentowane i wyczerpująco, choć ostrożnie przedyskutowane. Można znaleźć w nich potwierdzenie danych otrzymanych przez innych, jak te odnoszące się do kolistego rybosomalnego DNA, ale są też wyniki całkiem oryginalne jak te dotyczące struktury ściany komórkowej oraz profilu lipidowego „starych matek”. Z przeprowadzonych eksperymentów można wyciągnąć wiele interesujących wniosków, co niniejszym czynię, modyfikując to co habilitant napisał w Autoreferacie:

1. Na długość życia komórek drożdżowych może wpływać tło genetyczne.
2. W drożdżowym modelu starzenia się kluczowym jest badanie długości życia drożdży z uwzględnieniem okresu post-reprodukcyjnego, a nie tylko samego potencjału reprodukcyjnego.
3. Istnieje zależność między metabolizmem lipidów a czasem życia po okresie reprodukcyjnym.
4. Szczególnie interesująca wydała mi się charakterystyka komórek córek pochodzących od starych komórek matek. Mianowicie są one pozbawione mtDNA, a także są bardziej podatne na pęknięcia podwójnej nici DNA, mają zmienioną morfologię jąderka oraz zaburzenia w aparacie translacyjnym.
5. Interesujące jest również to, że komórki potomne pochodzące od starych komórek matek mają zredukowany potencjał reprodukcyjny, chociaż ich średni czas życia pozostaje taki sam jak w przypadku komórek szczepu kontrolnego.
6. Kluczowe w starzeniu komórek drożdży wydają się być zaburzenia komponentów budujących centrum GTP-azowego rybosomu.

7. Zwiększenie liczby kopii mRNA paralogów genu uL6 stanowi czynnik przyspieszający starzenie się i istotnie obniżający potencjał reprodukcyjny.
8. Białko uL11 ma dodatkowe funkcje związane z regulacją cyklu komórkowego.
9. Ściana komórkowa jest istotnym elementem w określaniu potencjału reprodukcyjnego szczepów. Komórki drożdży z zaburzeniami w biosyntezie ściany komórkowej mają zdolność do osiągnięcia mniejszej lub większej maksymalnej objętości niż szczep kontrolny i wydaje się, że hipertrofia, jak sądzono, nie może być jedynym czynnikiem ograniczającym potencjał reprodukcyjny komórek drożdży. Jest to bardzo ważne spostrzeżenie, w zasadzie nie potwierdzające wcześniejszej hipotezy prof. Bilińskiego, co świadczy o tym, jak jednak paradygmaty naukowe są zmienne.

Podsumowując, prace te są bardzo interesujące i wnoszą wiele nowych informacji na temat starzenia się drożdży, aczkolwiek, jak zauważa habilitant, trudno jest powiedzieć na ile otrzymane przez niego wyniki dotyczą tylko starzenia *S.cerevisiae*, a na ile mogą mieć odniesienie do tego procesu u wyższych Eukariontów. Aczkolwiek w ostatnim wniosku habilitanta odnajdujemy myśl, że „drożdże mogą stanowić dogodny model w badaniach nad starzeniem pod warunkiem wyeliminowania wpływu prywatnych dla drożdży czynników regulujących starzenie się.” Chyba z tym wnioskiem nie do końca się zgadzam. Każdy model starzenia ma swoje bardzo specyficzne cechy i raczej trzeba to uwzględnić niż eliminować. Na przykład komórki postmitotyczne nie dzielą się z definicji, ale trudno brak u nich hamowania cyklu komórkowego charakterystycznego dla starzenia się komórek proliferujących „eliminować”. Starzenie się fibroblastów wiąże się z fragmentacją kolagenu, czego nie obserwujemy w przypadku innych komórek. Takich przykładów jest dużo więcej. W zasadzie czasem wręcz trudno jest mówić o uniwersalnych cechach starzenia.

Natomiast nie podoba mi się autoreferat w języku polskim, bo tylko z takim się zapoznałam. Jest on długi i rozwlekły, ale nie to jest jego najsłabszą stroną, którą jest dość nieporządkny język. Habilitant ponad 50 razy użył słowa poziom lub na poziomie odnoście danych ilościowych jak i innych. Jednym słowem, niemal wszystko co habilitant mierzył, to mierzył i badał to „na poziomie” zaczynając od ilości mRNA, rDNA i fosfolipidów, monosomów i polisomów poprzez, tu cytuję: „analiza czasu podwojenia na poziomie pojedynczych komórek”, „zaburzeń, na poziomie centrum GTPazowego rybosomu”, „analizy na poziomie pojedynczych komórek”, „na poziomie blizn podziałowych”, „na poziomie standardowych procedur wzrostowych”, „na poziomie ściany komórkowej”, „na poziomie biosyntezy ściany komórkowej”, „poziomie pozyskiwania energii”, „na poziomie oddychania tlenowego”, „na poziomie szczepu kontrolnego”, „na poziomie aberracji chromosomów”, „w poziomie chromosomu XII”, „na poziomie architektury jąderka”, „na poziomie maszyneryi translacyjnej”, „na poziomie starzenia”, „na poziomie cyklu komórkowego”, „poziom zahamowania translacji”, „poziom wprowadzania błędnego aminokwasu”.

Zdarzają się też bardzo niefortunne sformułowania jak: „...szukano możliwych powiązań między wybranymi parametrami długowieczności i metabolicznym, odciskiem palca”, populacji komórek wygenerowanych za pomocą spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR).” oraz: „obserwacje fenotypu pęknięcia komórek są stosunkowo rzadkie u drożdży, w dodatku praktycznie nie do zarejestrowania na poziomie standardowych procedur wzrostowych stosowanych u drożdży”, „Wykorzystane tło genetyczne BY4741 charakteryzuje się niewielkimi rozmiarami komórek, ...”, „Komórka matka zatrzymuje wszystkie uszkodzenia w swoich komórkach.” Ponadto, habilitant czasami używa zamiennie sformułowania długość życia i długowieczność, co nie do końca jest prawidłowe, chociaż jak zauważyłam, również stosowane przez innych autorów. Dobrze jednak jest pamiętać, że „lifespan” to po polsku po prostu długość życia, czyli czas trwania życia danego osobnika, a „longevity” to długowieczność, czyli życie trwające dłużej niż przeciętnie. Oczywiście badania procesu starzenia jakiegokolwiek komórki czy też organizmu nie mogą być prowadzone w oderwaniu od długości życia, dlatego też te sformułowania te często idą ze sobą w parze.

4. Podsumowanie

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe, a także całościowy dorobek zarówno naukowy, dydaktyczny spełnia wszelkie wymogi formalne i merytoryczne wynikające z art. 219 ust. 1 pkt 2b ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.). W tym:

- a/ posiadanie stopnia doktora
- b/ przedstawienie cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych
- c/ aktywność naukowa w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej krajowej.

Ponadto wniosek jest zgodny z wszystkimi wskazówkami dla występujących o stopień doktora habilitowanego. Zarówno cały dorobek naukowy jak i wyodrębnione osiągnięcie naukowe Pana dr Mateusza Mołonia oceniam wysoko. Moja opinia dotyczy zarówno walorów poznawczych i nowatorstwa tych prac, jak również osiągnięć habilitanta w sferze organizacji życia naukowego i dydaktycznego. Jego badania doprowadziły do poznania szeregu procesów, które w sposób istotny wzbogaciły naszą wiedzę dotyczącą starzenia i długości życia *S.cerevisiae*. Przedstawiony do oceny cykl prac stanowi znaczący wkład w rozwój nauk biologicznych. W moim przekonaniu są to wyniki bardzo wartościowe i pokazujące, że na modelu drożdżowym można jeszcze dokonać wielu wartościowych odkryć, zwłaszcza w oparciu o nowoczesne techniki badawcze.

Wobec powyższego z pełnym przekonaniem popieram starania dr. Mołonia o uzyskanie stopnia naukowego dr habilitowanego.

